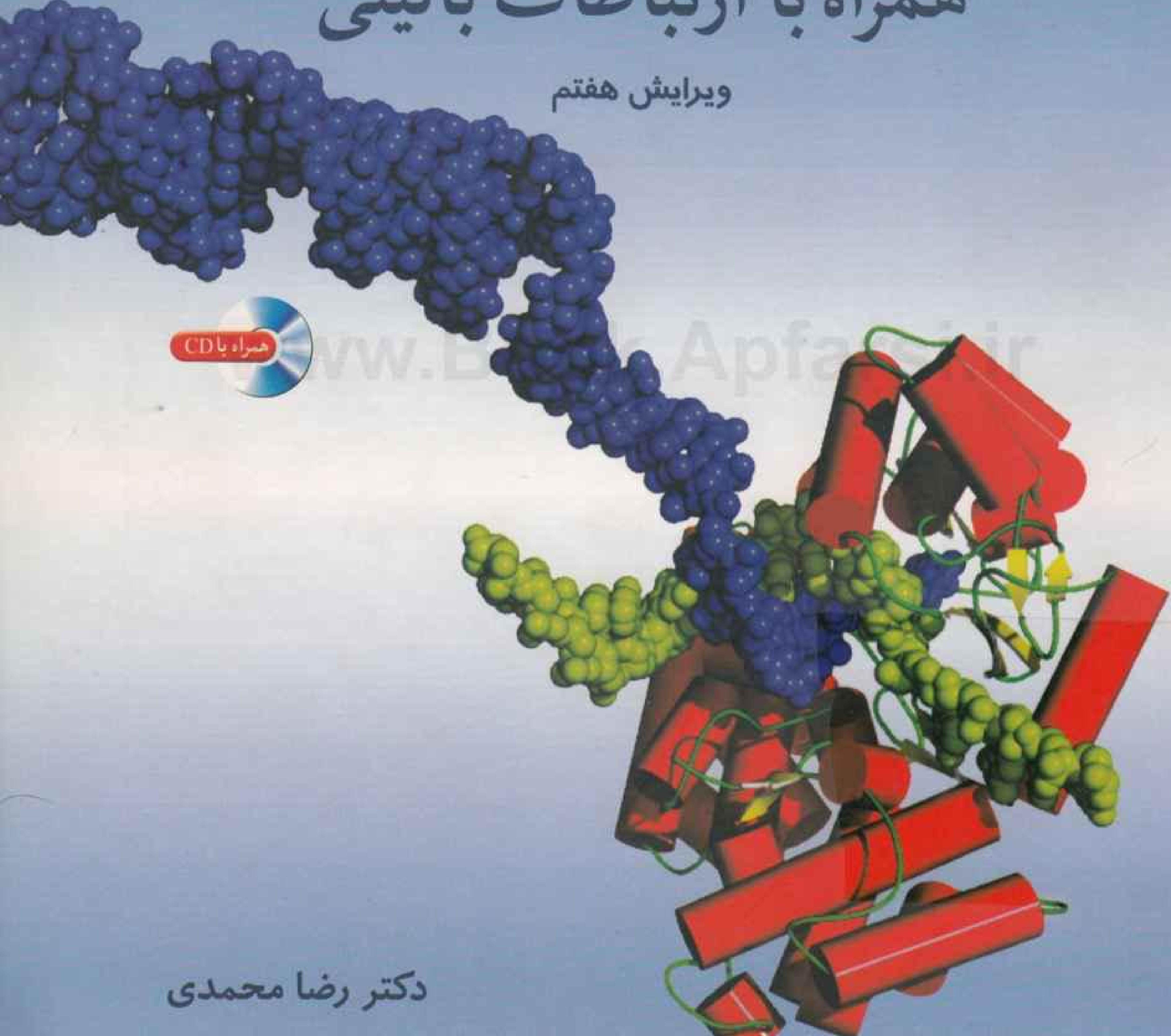
جلد اول

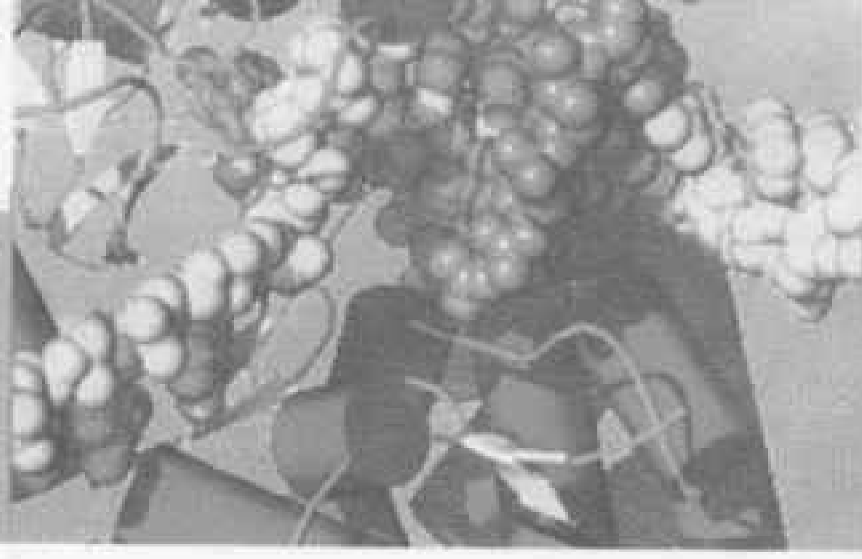
بیوشیمی دولین

همراه با ارتباطات بالینی

ویرایش هفتم



دکتر رضا محمدی



بیوشیمی دولین

همراه‌با ارتباطات بالینی (۱)

عنوان و نام‌پدیدآور	: بیوشیمی با ارتباط بالینی [کتاب]/ مولف [صحیح: ویراستار] توماس‌ام. دولین؛ مترجم رضا محمدی.
مشخصات نشر	: تهران: آییژ، ۱۳۹۲.
مشخصات ظاهری	: ۲ج.: مصور، جدول، نمودار؛ ۲۹×۲۲ س‌م.
شابک	: دوره: 978-964-970-459-3؛ ج.۱: 978-964-970-457-9؛ ج.۲: 978-964-970-458-6
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: عنوان اصلی: Textbook of biochemistry: with clinical correlations, 7th. ed, c2011.
یادداشت	: ترجمه‌ی ویراست‌های قبلی کتاب حاضر نخستین بار تحت عنوان «بیوشیمی با کاربرد بالینی» منتشر شده است.
یادداشت	: نمایه.
عنوان دیگر	: بیوشیمی با کاربرد بالینی.
موضوع	: زیست‌شیمی
موضوع	: زیست‌شیمی بالینی
شناسه افزوده	: دولین، تامس ام.، ویراستار
شناسه افزوده	: Devlin, Thomas M
شناسه افزوده	: محمدی، رضا، ۱۳۴۳-، مترجم
رده‌بندی کنگره	: QP ۵۱۴/۲/ب۹۵ ۱۳۹۲ الف
رده‌بندی دیویی	: ۶۱۲/۰۱۵
شماره کتابشناسی ملی	: ۳۲۹۰۷۸۸

آییژ

بیوشیمی دولین همراه با ارتباطات بالینی (۱)

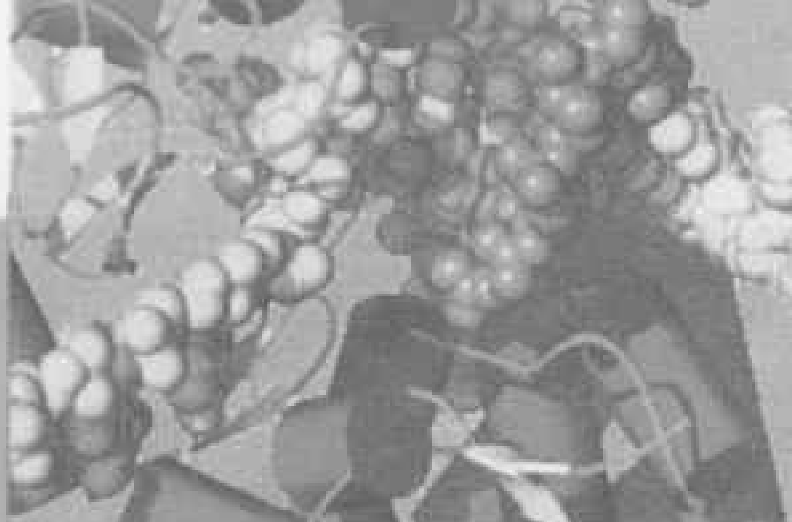
تالیف	توماس ام. دولین
ترجمه	دکتر رضا محمدی
ناشر	آییژ
قطع	رحلی
ویرایش	هفتم
نوبت چاپ	اول
تاریخ	تابستان ۱۳۹۳
تیراژ	۲۰۰۰
صفحات	۷۷۶
شابک	۹۷۸-۹۶۴-۹۷۰-۴۵۷-۹
شابک دوره	۹۷۸-۹۶۴-۹۷۰-۴۵۹-۳
لیتوگرافی	نورنگ ۷۷۵۲۹۳۶۳-۷۷۵۳۱۰۲۷
چاپ‌وصحافی	طرفه ۵۵۲۶۹۲۸۷-۸

۳۵۰۰۰ تومان

کتابیران: تهران، میدان انقلاب، ابتدای خیابان آزادی، خیابان دکتر قریب، بعد از فرصت شیرازی، پلاک ۷، تلفن: ۱۸ - ۹-۶۶۵۶۶۵۰

نوپردازان: تهران، خیابان لباف‌ی‌نژاد، بین اردیبهشت و فروردین، پلاک ۲۳۸
تلفن: ۶۶۴۱۴۴۷۴ - ۶۶۴۱۴۵۱۵ - ۶۶۴۱۱۱۷۳ - ۶۶۴۹۴۴۰۹

فروش اینترنتی WWW.Ketabiran.ir



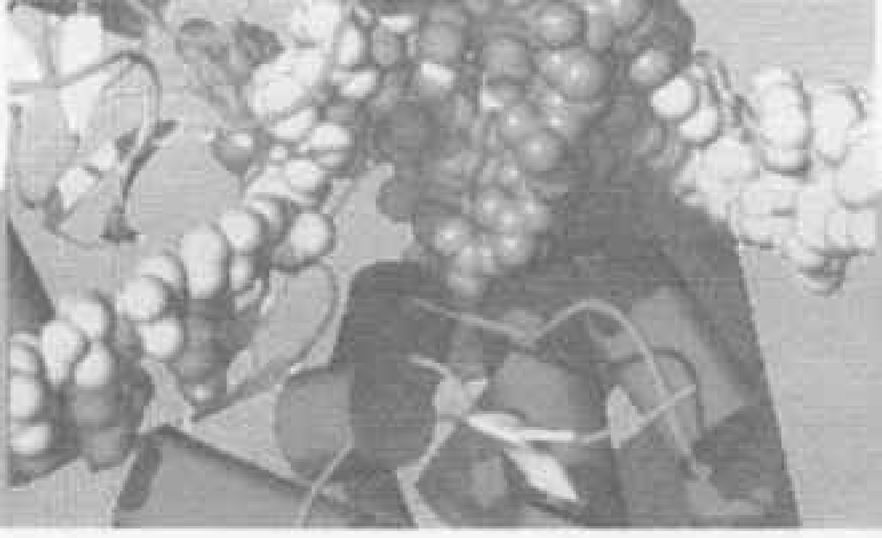
پیشگفتار مترجم

کتاب بیوشیمی دولین از معتبرترین کتاب‌های بیوشیمی است که در ایران به‌خوبی شناخته شده است و علاقمندان و طرفداران زیادی دارد. شاید بیشترین محبوبیت این کتاب، کادرهایی باشد که به ارتباط بین مطالب پایه بیوشیمی و کاربرد بالینی آنها می‌پردازد. کتاب شامل ۲۷ فصل است که در پنج قسمت دسته‌بندی شده‌اند. قسمت اول مربوط به ساختمان ماکروملکول‌ها است و در این راستا به ساختمان سلول اوکاریوتی، ساختمان DNA و RNA و نهایتاً ساختمان پروتئین می‌پردازد. قسمت دوم به انتقال اطلاعات اختصاص داده شده است که شامل فصول مربوط به حفظ اطلاعات ژنتیکی، انتقال این اطلاعات از یک نسل سلولی به نسل دیگر، بیان این اطلاعات طی فرایندهای رونویسی و ترجمه، تنظیم بیان ژن و بیوتکنولوژی و DNA نوترکیب می‌باشد. قسمت سوم مربوط به عملکرد پروتئین‌ها است و در این راستا به مباحثی شامل ارتباط ساختمان و عملکرد پروتئین، آنزیم‌ها، سیتوکروم‌ها، غشاءهای بیولوژیکی و عملکرد اجزاء پروتئینی آن و نهایتاً انتقال پیام می‌پردازد. فصول قسمت چهارم کتاب به تشریح مسیرهای متابولیکی مرتبط با کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، اسیدهای آمینه، هِم و نوکلئوتیدها و نحوه کنترل این مسیرها می‌پردازند. برای تکمیل مطالب این قسمت، در دو فصل انتهایی ارتباطات متابولیکی بین بافت‌ها و اعضاء بدن در شرایط مختلف و نقش هورمون‌ها در این فرایندها مورد بحث قرار گرفته‌اند. بالاخره، قسمت پنجم مربوط به فرایندهای فیزیولوژیکی است که فصول آن به حوادثی نظیر انتقال پیام‌های عصبی، بینایی، انقباض عضلانی، چرخه سلولی و سرطان به همراه هضم و جذب مواد غذایی، نقش ویتامین‌ها، مواد معدنی و درشت‌مغذی‌ها در سلامت و بیماری انسان اشاره دارند. علاوه بر این پنج قسمت، در انتهای کتاب ضمیمه‌ای در نظر گرفته شده است که اشاره به شیمی آلی بیومولکول‌های اصلی بدن و اصطلاحات مربوطه دارد. لذا توصیه می‌شود که در ابتدا این قسمت مطالعه شود.

وجود تصاویر رنگی سبب افزایش درک دانشجو و تسهیل در آموزش می‌شود. با توجه به هزینه بالای چاپ کتاب رنگی، تصمیم گرفته شد تا کتاب تک رنگ چاپ شود و تصاویر رنگی به‌صورت CD در اختیار دانشجویان و علاقمندان محترم قرار گیرد. لذا در مواقع لازم، به‌خصوص در مواردی که در توضیح اشکال به رنگ تصاویر اشاره شده است، می‌توانید با مراجعه به این CD از تصاویر رنگی بهره لازم را ببرید.

از دانشجویان و همکاران گرامی خواهشمندم نظرات، انتقادات و پیشنهادات خود را از طریق پست الکترونیکی rmbiochem@yahoo.com با اینجانب در میان بگذارند. در خاتمه لازم می‌دانم از مدیریت انتشارات آییژ و کارمندان این مؤسسه کمال تشکر را داشته باشم که با تلاش آنها امکان چاپ و انتشار این کتاب فراهم شد.

دکتر رضا محمدی



خلاصه فصل

جلد اول

بخش ۱
ساختمان ماکروملکول‌ها

بخش ۲
انتقال اطلاعات

بخش ۳
عملکرد پروتئین‌ها

جلد دوم

بخش ۴
مسیرهای متابولیک و کنترل آنها

بخش ۵
فرایندهای فیزیولوژیکی



فهرست مطالب

۷ DNA نوترکیبی و بیوتکنولوژی ۳۴۵

۸ تنظیم بیان ژن ۴۱۳

بخش ۳

عملکرد پروتئین‌ها

۹ پروتئین‌ها II: ارتباطات ساختمان-عملکرد در خانواده‌های پروتئینی ۴۵۱

۱۰ آنزیم‌ها: طبقه‌بندی، کینتیک و کنترل ۵۰۹

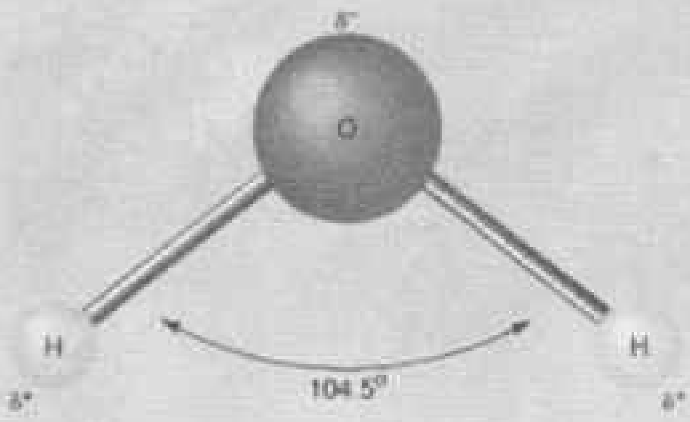
مفاهیم کلیدی

۱۱ سیتوکروم‌های P450 و اکسیدنیتریک سنتازها ۵۷۵

۱۲ غشاءهای بیولوژیک: ساختمان، گیرنده‌ها و انتقال مواد ۶۱۷



۱



ساختمان سلول اوکاریوتی

مفاهیم کلیدی

- تمامی موجودات زنده متشکل از سلول‌های مجزایی هستند که هر کدام از آنها توسط یک غشاء لیپیدی خارجی تعیین می‌شوند. سلول‌ها می‌توانند انواع مختلفی از ساختمان‌های داخل سلولی را داشته باشند.
- سلول‌های زنده شامل آراکی‌ها، اوباکتری‌ها، و اوکاریوت‌ها هستند. موجودات چندسلولی می‌توانند انواع مختلفی از سلول‌های تخصص یافته را داشته باشند.
- سلول‌های زنده محیط داخل‌سلولی راکنترل می‌کنند، مواد را از محیط برای تولید انرژی و سنتز ملکول‌های مورد نیاز برداشت می‌کنند و قادر به همانند-سازی خود هستند.
- آب یک جزء ضروری سلول‌های زنده است. ملکول‌های آب با یکدیگر و با ملکول‌های دیگر پیوند هیدروژنی ایجاد می‌کنند.
- اسیدهای ضعیف و گروه‌های اسیدی موجود بر روی ماکروملکول‌ها به سلول‌ها امکان کنترل غلظت یون هیدروژن (pH) داخل‌سلولی خود را می‌دهند.
- سلول‌های پستانداران به انواع مختلفی از ساختمان‌های داخل‌سلولی بخش‌بندی می‌شوند که هر کدام فعالیت‌های تخصص یافته‌ای را برعهده دارند.
- فعالیت‌های سلولی یکپارچه شده و می‌توانند توسط مکانیسم‌های داخل سلولی و عوامل خارج‌سلولی کنترل شوند.

۱-۱ • سلول‌ها اساس موجودات زنده هستند

اساس تمام موجودات زنده، از ساده‌ترین تا پیچیده‌ترین آنها، را واحدی از فضا تشکیل می‌دهد که توسط یک غشاء احاطه شده است. این واحد از فضا را سلول گویند. قطر این فضا احاطه‌شده می‌تواند از ۱۰ تا ۱۰,۰۰۰ میکرون متفاوت باشد و برحسب موجود زنده می‌تواند درجات متفاوتی از پیچیدگی ساختمانی درونی را داشته باشد. تمامی سلول‌های زنده به‌صورت سلول‌های واحد مستقل نظیر باکتری‌ها و یا به‌صورت موجودات پرسلولی نظیر انسان با بیش از ۱۰۰ تریلیون سلول وجود دارند. بدون توجه به پیچیدگی موجود زنده، سلول‌های بیولوژیکی مجزا، خصوصیات مشترک زیر را دارند:

- بسیاری از یون‌های معدنی و ملکول‌های آلی یکسان، شامل کربوهیدرات‌ها و لیپیدها، به همراه ماکروملکول‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک.
- یک غشاء سلولی خارجی تحت عنوان **غشاء پلاسمایی** متشکل از فسفولیپیدها و پروتئین‌های **دوگانه‌دوست**. این غشاء حدود فضای اشغال‌شده را تعیین نموده و یک محیط متغیر و دارای پتانسیل خصومت‌آمیز را از یک محیط داخل سلولی نسبتاً ثابت جدا می‌کند.
- سیستم‌هایی که بین محیط‌های درونی و بیرونی ارتباط برقرار می‌کنند.
- توانایی در تغییر شکل منابع انرژی خارجی به انرژی قابل مصرف جهت نیرودادن به واکنش‌های انرژی‌گیر در سلول. این منابع خارج‌سلولی شامل نور، ملکول‌های آلی، و شیب‌های غلظتی ملکول‌ها در عرض غشاءها می‌باشند.
- توانایی در تبدیل مواد غذایی خورده‌شده به اجزاء سلولی مورد نیاز و حذف مواد تجزیه‌شده و سمی. واکنش‌های مربوط به این فرایندها توسط کاتالیست‌های پروتئینی، یعنی آنزیم‌ها، کاتالیز می‌شوند.
- توانایی در سنتز ماکروملکول‌هایی نظیر اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها.
- یک ژنوم از **اسید داکسی ریبونوکلئیک** (DNA) حاوی ساختمان‌هایی برای تمامی فعالیت‌های سلولی.
- توانایی در همانندسازی، انتقال اطلاعات ژنومیکی ارثی به سلول‌های زاده خود.

تقریباً ۳/۷ میلیارد سال قبل، تحت شرایطی که کاملاً مشخص نیست و طی زمانی که به سختی قابل درک است، ترکیبات شیمیایی ساده از عناصر هیدروژن، اکسیژن، نیتروژن، سولفور، و فسفات تولید شدند. اینها ترکیب شدند، متفرق شدند و دوباره ترکیب شدند تا ملکول‌های بزرگتر متنوعی را به‌وجود آورند که خود سازنده ساختمان‌هایی با قابلیت همانند-سازی بودند. هر چند، هیچ مدرک قطعی از شرایط محیطی که این واکنش‌ها را مساعدت می‌کردند، وجود ندارد. با ادامه تولید ملکول‌های پیچیده‌تر، این ملکول‌های خود-همانندساز توسط یک غشاء کپسول‌دار شدند و سلول‌ها را به‌وجود آوردند. با گذشت زمان، این اشکال ساده حیات به سلولی تبدیل شدند که «آخرین جد مشترک» تمامی میلیون‌ها گونه و زیرگونه

موجود بر روی زمین، شامل انسان، را به‌وجود آورد. «آخرین جد مشترک[۱]» تمامی انسان‌ها حدود ۴۵۰ سال قبل ظاهر شد. تکامل موجودات ادامه یافت. تنوع وسیع زندگی امروزی، از ساده‌ترین باکتری‌ها تا پیچیده‌ترین موجودات پرسلولی نظیر گیاهان و حیوانات، محصول این تغییرات تکاملی هستند.

طبقه‌بندی سلول‌های زنده

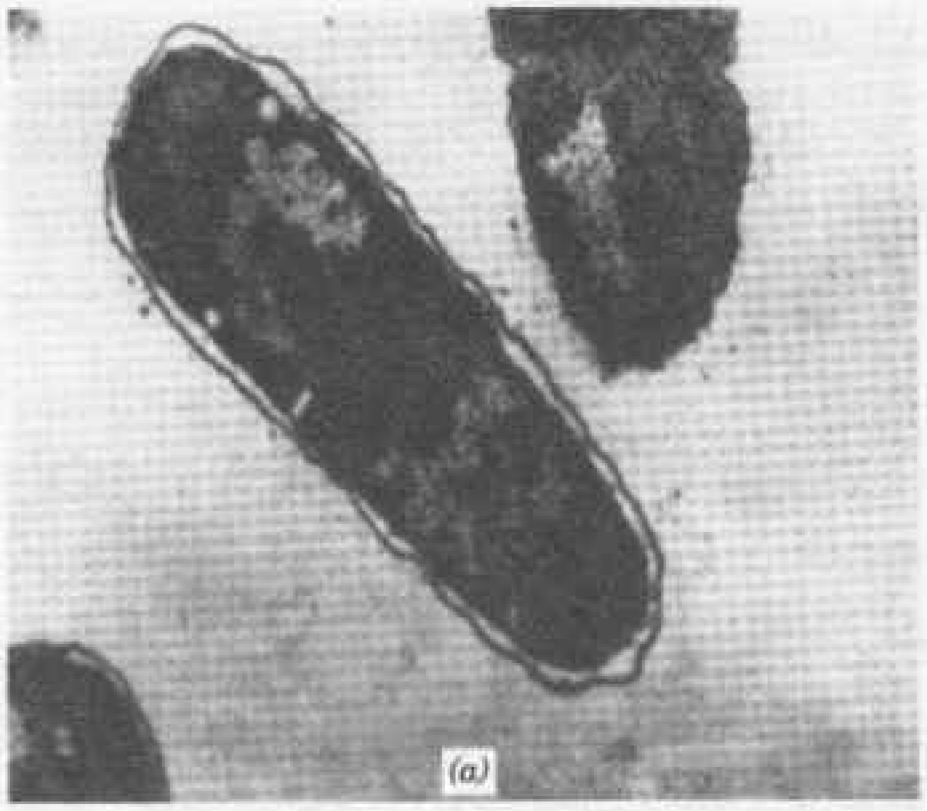
تمامی موجودات زنده در یکی از سه دومن اصلی آرکی‌ها، اوباکتری‌ها و اوکاریوت‌ها گروه‌بندی می‌شوند. زیرا تمامی این سه دومن از یک سلول پیش‌ساز مشترک[۲] ناشناخته منشاء می‌گیرند.

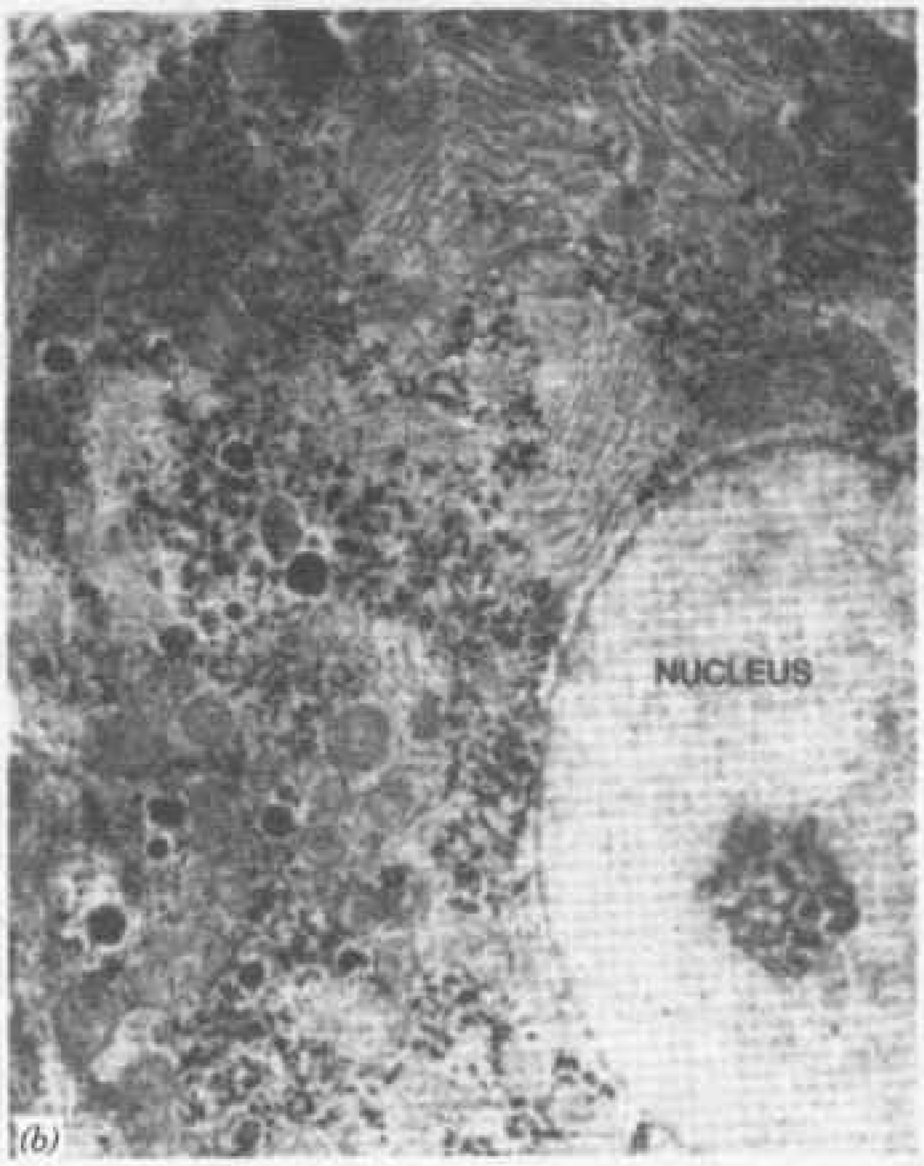
آرکی‌ها که ممکن است ابتدایی‌ترین دومن باشد، و باکتری‌ها که شامل باکتری‌های معمول می‌باشند، تحت عنوان **پروکاریوت‌ها** طبقه‌بندی می‌شوند، زیرا خصوصیات ساختمانی مشترک زیادی، شامل نداشتن هسته مشخص یا ساختمان‌های غشایی درونی، دارند. اینها معمولاً تک‌سلولی هستند (شکل a۱–۱)، ولی در برخی موارد تولید کلونی‌ها یا فیلمان‌هایی می‌کنند. پروکاریوت‌ها تنوع شکل و اندازه را دارند و قادرند تحت شرایط متنوعی، برخی بسیار سخت، زندگی کنند. غشاء پلاسمایی معمولاً تورفته[۳] می‌باشد. DNA پروکاریوت‌ها شامل یک رشته حلقوی است و اغلب به‌صورت توده مجزایی، ناحیه **نوکلوئید**[۴]، در داخل سلول جدا می‌شود که توسط غشاء یا پوشش[۵] احاطه نمی‌گردند. حتی بدون بخش‌های غشایی مشخص، محیط داخل سلولی پروکاریوت‌ها به‌صورت بخش‌های وظیفه‌داری[۶] سازماندهی می‌شوند.

اوکاریوت‌ها شامل موجودات تک-سلولی نظیر مخمرها، قارچ‌ها، و گیاهان و حیوانات چندسلولی هستند. حجم سلولی آنها ۱۰۰۰ تا ۱۰,۰۰۰ برابر بزرگتر از اکثر سلول‌های پروکاریوتی است. اوکاریوت‌ها یک **هسته** مشخص با یک غشاء کاملاً مشخص دارند که DNA سلولی را در برمی‌گیرد. این سلول‌ها همچنین سیستم‌های غشایی و **اندامک‌های** داخل سلولی وسیعی را دارند که توسط غشاء احاطه شده‌اند (شکل b۱–۱). این سیستم‌های غشایی داخل سلولی، بخش‌های سلولی مجزا را ایجاد می‌کنند (ص ۲۰) که خود امکان درجات بی‌همتایی از سازماندهی تحت‌سلولی را به‌وجود می‌آورد. از طریق بخش‌بندی[۷]، واکنش‌های شیمیایی مختلفی که نیاز به محیط‌های متفاوتی دارند، می‌توانند به‌طور همزمان وجود داشته باشند.

اجزاء شیمیایی پایه و واکنش‌های شیمیایی پایه تمامی موجودات زنده، پروکاریوت‌ها یا اوکاریوت‌ها، بسیار شبیه هستند. با این وجود تفاوت‌های قابل‌ذکر زیادی در ترکیب مثال، پروکاریوت‌ها فاقد هیستون‌ها هستند که یک کلاس شدیداً حفظ‌شده پروتئین‌ها در

1. Last common ancestor
2. Common precursor cell
3. Invaginated
4. Nucleoid
5. Envelope
6. Fuctional
7. Compartmentalization





شکل ۱-۱ سازماندهی سلولی در سلول‌های پروکاریوتی و اوکاریوتی. (a) میکروگراف الکترونی *Escherichia coli* به‌عنوان نمونه‌ای از پروکاریوت‌ها. بزرگنمایی تقریباً ۳۰،۰۰۰ برابر. تا حدودی سازماندهی درون سلولی وجود دارد، ولی اندامک احاطه‌شده توسط غشاء وجود ندارد. کروماتین در یک نوکلوئید متراکم شده است، ولی توسط غشاء محصور نیست. سلول‌های پروکاریوتی بسیار کوچک‌تر از سلول‌های اوکاریوتی هستند. (b) میکرگراف الکترونی یک برش از یک سلول کبدی (سلول کبدی موش صحرایی)، به‌عنوان نمونه‌ای از سلول‌های اوکاریوتی. بزرگنمایی تقریباً ۷۵۰۰ برابر. به غشاء هسته مجزا، اندامک‌ها یا وزیکول‌های مختلف احاطه‌شده توسط غشاء و سیستم‌های غشایی گسترده توجه کنید.

تمامی اوکاریوت‌ها می‌باشند که با DNA کمپلکس می‌شوند (ص ۷۵). همچنین تفاوت‌هایی در محتوای آنزیمی و در کمپلکس‌های اسید ریبونوکلئیکی-پروتئینی، تحت عنوان ریبوزوم‌ها، وجود دارد که در بیوسنتز پروتئین نقش دارند. عمومیت بسیاری از فرایندهای بیوشیمیایی، امکان تعمیم اطلاعات از پروکاریوت‌ها به اوکاریوت‌ها، از جمله انسان، را فراهم می‌سازد.

در سرتاسر این کتاب، تأکید بر بیوشیمی اوکایوت‌ها به‌خصوص پستانداران است، هرچند بسیاری از اطلاعات مربوط به بیوشیمی سلول‌های زنده از مطالعات انجام‌شده بر روی سلول‌های پروکاریوتی و اوکاریوتی غیرپستانداران به‌دست آمده‌اند.

۲-۱ • محیط سلول‌ها: آب و مواد حل‌شده

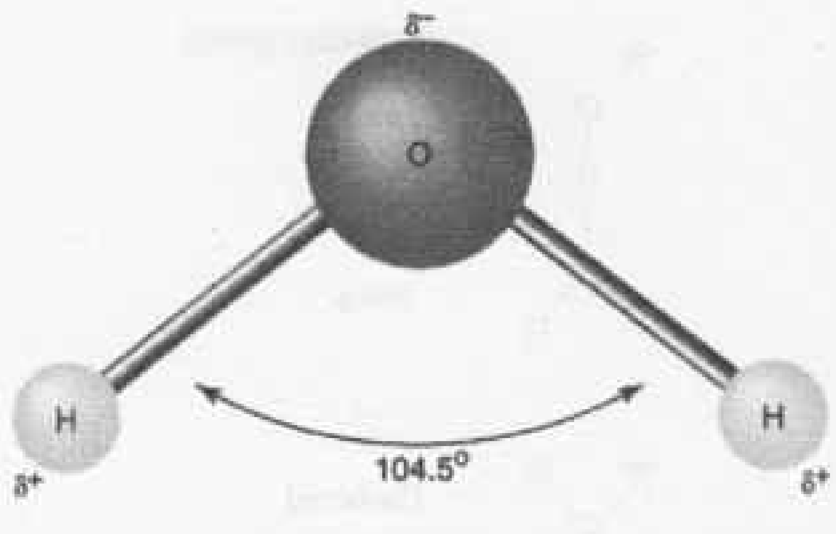
حیاتی که ما می‌شناسیم به‌دلیل وجود آب است که یک جزء مشترک تمامی سلول‌های بیولوژیکی و محیط خارج‌سلولی آنها می‌باشد.

پیوندهای هیدروژنی بین ملکول‌های آب به‌وجود می‌آیند

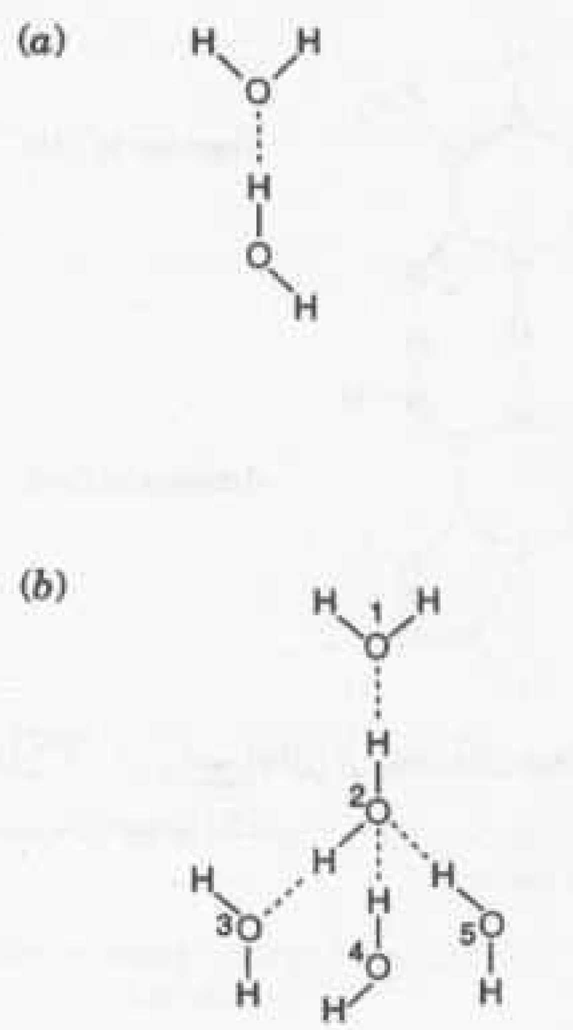
تعامل پویای ملکول‌های آب منجر به «ساختمان پویای آب» در سیستم‌های آبی می‌شود. یک ملکول آب زمانی تولید می‌شود که دو اتم هیدروژن الکترون‌های خود را با یک جفت الکترون غیراشتراکی یک اتم اکسیژن به اشتراک می‌گذارند (شکل ۲-۱). آب یک ملکول قطبی است، زیرا هسته اکسیژن، در مقایسه با هیدروژن، الکترون‌های اشتراکی را قوی‌تر جذب می‌کند، و هسته‌های هیدروژنی دارای بار مثبت با یک اشترک نابرابر الکترون‌ها باقی می‌مانند. در نتیجه، یک بار نسبی مثبت بر روی هر دو اتم هیدروژن و یک بار نسبی منفی بر روی اکسیژن وجود دارد. زاویه پیوند بین اتم‌های هیدروژن و اکسیژن ۱۰۴٫۵° است که ملکول را از نظر الکتریکی نامتقارن می‌کند و بنابر این یک دو قطبی الکتریکی را به‌وجود می‌آورد.

به‌دلیل وجود جاذبه بین اتم‌های هیدروژن دارای بار مثبت بر روی یک ملکول و اتم‌های اکسیژن دارای بار منفی موجود در ملکول‌های دیگر آب، این ملکول‌ها با یکدیگر در تعامل هستند. یک پیوند ضعیف بین دو ملکول آب به‌وجود می‌آید (شکل ۳a-۱). این پیوند که با یک خط غیرممتد نشان داده می‌شود، یک **پیوند هیدروژنی** است. مطالعات اخیر مطرح کرده‌اند که پیوند موجود در بین دو ملکول آب، تا حدودی کووالان است. پیوندهای هیدروژنی در مقایسه با پیوندهای کووالان نسبتاً ضعیف هستند، ولی تعداد زیاد آنها دلیل پایداری آب مایع می‌باشد. در صفحه ۱۵۸ به جزئیات مربوط به تعاملات غیرکووالان، شامل انواع الکترو استاتیک، واندروالس و آبگریز، بین ملکول‌ها پرداخته می‌شود.

پنج ملکول آب از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی تولید یک **ساختمان چهاروجهی** می‌کنند (شکل ۳b-۱) که در آن هر اتم اکسیژن الکترون‌های خود را با چهار اتم هیدروژن، و هر اتم هیدروژن با اکسیژن دیگر به اشتراک می‌گذارد. این ساختمان شبکه چهار وجهی مسئول تولید ساختمان کریستالی یخ می‌باشد. در حالت انتقالی از یخ به آب مایع، تنها برخی پیوندهای هیدروژنی شکسته می‌شوند. با شکستن پیوندهای هیدروژنی و تولید پیوندهای جدید، آب مایع یک ساختمان سریعاً در حال تغییر به‌وجود می‌آورد؛ نیمه‌عمر پیوندهای هیدروژنی در آب کمتر از $1\times10^{-11}s$ می‌باشد. لذا ساختمان آب مایع دائماً در حال تغییر بین انواع مختلفی از ساختمان‌های حاوی تعداد زیادی ملکول آب است که خود دائماً در حال تولید و تغییر هستند. آب در سطح ملکولی ناهمگن و با ساختمان‌های پویایی است که حاوی دستجاتی از ملکول‌های آب با اندازه‌های مختلف می‌باشد که در آنها صدها ملکول شرکت دارند. حتی در ۱۰۰°C، آب مایع تعداد قابل توجهی پیوند هیدروژنی دارد که دلیل گرمای تبخیر بالای آن می‌باشد. در تغییر شکل از



شکل ۲-۱ ساختمان یک ملکول آب. زاویه پیوند H—O—H برابر ۱۰۴٫۵° است. هر دو اتم هیدروژن بار نسبی مثبت دارند و اتم اکسیژن دارای بار نسبی منفی است، نتیجه تولید یک دوقطبی می‌باشد.



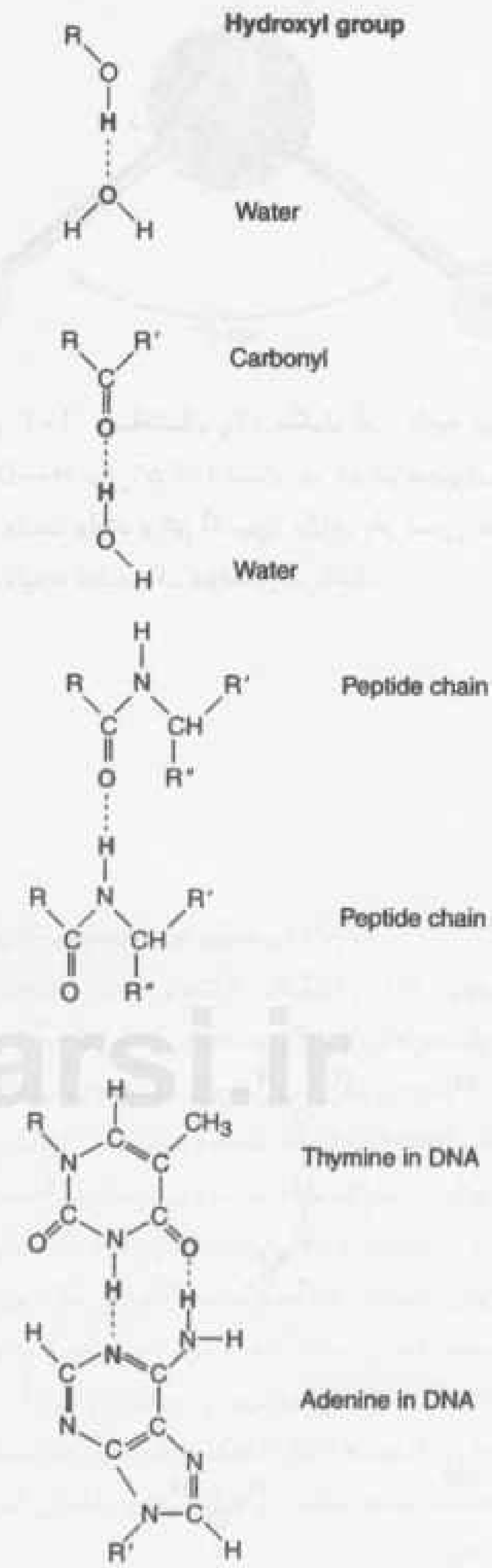
شکل ۳-۱ ایجاد پیوند هیدروژنی در آب. (a) پیوند هیدروژنی با خط منقطع بین دو ملکول نشان داده شده است. (b) ایجاد پیوند هیدروژنی چهاروجهی بین پنج ملکول آب، ملکول‌های آب ۱، ۲ و ۳ در یک صفحه قرار دارند، در حالی‌که ملکول‌های ۴ و ۵ به‌ترتیب در زیر و بالای این صفحه قرار دارند.

مایع به حالت بخار، پیوندهای هیدروژنی از بین می‌روند. مدل‌های زیادی برای ساختمان آب مایع مطرح شده است که هیچکدام از آنها به‌خوبی تمامی خصوصیات آن را توجیه نمی‌کنند.

ساختمان آب خالص زمانی تغییر می‌کند که اتم‌های آن با یون‌ها و ساختمان‌های شیمیایی دیگر ایجاد پیوند هیدروژنی کنند. تعامل ملکول‌های آب با ملکول‌های دیگر منجر به تغییرات اساسی در جهت‌گیری آب می‌شود. به‌عنوان مثال، ملکول‌های آب در نزدیکی سطح غشاءها بسیار منظم هستند که دلیل آن ماهیت دوگانه‌دوست فسفولیپیدهای غشایی (ص ۶۲۸) می‌باشد. آب موجود بر روی و در داخل ملکول‌های مربوط به پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، سبب تثبیت این ماکرو ملکول‌ها می‌شود. به‌دلیل ترکیب یونی متفاوت، ساختمان آب ممکن است در محیط آبی خارج‌سلول متفاوت از ساختمان داخل‌سلولی باشد.

موادی که باید در سلول‌ها وجود داشته باشند، در آب حل [1] و یا معلق [2] می‌شوند و فعالیت آنها تحت تأثیر سازماندهی ملکول‌های آب قرار می‌گیرد. در و بر روی سطح ماکرو-ملکول‌ها و بر روی سطح غشاءهای لیپیدی، به‌دلیل تعامل آب با گروه‌های موجود در این ملکول‌ها، ریز محیط‌هایی با ساختمان‌های متفاوت آب به‌وجود می‌آیند. وجود این ریز محیط‌ها می‌تواند منجر به تنوع در فعالیت یون‌ها و ملکول‌ها در داخل جایگاه‌های مختلف موجود در یک سلول شود.

پیوندهای هیدروژنی همچنین بین ملکول‌هایی غیر از آب، در هر محلی به‌وجود می‌آیند که اتم‌های الکترونگاتیو اکسیژن یا نیتروژن در مجاورت اتم‌های هیدروژنی قرار می‌گیرند که اتصال کووالان به اتم الکترونگاتیو دیگر دارند. نمونه‌هایی از پیوندهای هیدروژنی در شکل ۴-۱ آورده شده‌اند. ایجاد پیوند هیدروژنی درون ملکولی منحصراً در ماکروملکول‌های بزرگی نظیر پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک رخ می‌دهد؛ این پیوندها تا حدودی مسئول ثبات ساختمانی آنها می‌باشند.



شکل ۴-۱ نمونه‌هایی از پیوندهای هیدروژنی مهم در سیستم‌های بیولوژیک.

آب خصوصیات بی‌همتای مربوط به حلال را دارد

ماهیت قطبی آب و ناپایداری آن در جهت تولید پیوندهای هیدروژنی، اساس توانایی آب در انحلال ملکول‌های معدنی و آلی است. ملکول‌های قطبی نظیر املاح براحتی در آب پخش می‌شوند. شبکه کریستالی **املاح** از طریق تعامل اتم‌ها یا گروه‌های دارای بارهای مثبت و منفی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. علت حلالیت این ترکیبات در آب این است که جاذبه این اجزاء باردار با آب دوقطبی بر نیروهای الکترواستاتیک موجود در کریستال غلبه می‌کند. جاذبه بین Na^+ و بار منفی موجود بر روی اتم‌های اکسیژن آب، و Cl^- با بار مثبت موجود در اتم‌های هیدروژن، بر جاذبه موجود در بین اتم‌های باردار Na^+ و Cl^-

1. Dissolve 2. Suspend

در NaCl غلبه می‌کند. در داخل محلول، یون‌های مجزا توسط قشری از ملکول‌های آب احاطه می‌شوند. تعداد تعاملات بار - بار بین آب و یون‌های Na^+ و برای حفظ جدایی فیزیکی این یون‌های باردار کافی است.

به‌دلیل جذب گروه‌های قطبی به ملکول‌های آب، ملکول‌های آلی غیریونی حاوی گروه‌های قطبی ضعیف نیز در آب محلول هستند. به‌همین دلیل قندها و الکل‌ها به‌راحتی در آب حل می‌شوند. ترکیباتی که هر دو گروه قطبی و غیرقطبی را دارند، یعنی ملکول‌های **دوگانه‌دوست**[1]، در صورتی می‌توانند در آب پخش شوند که گروه قطبی آب بتواند بر تعاملات آبگریز قسمت‌های آبگریز این ملکول‌ها غلبه کند. ملکول‌های بسیار آبگریز، نظیر لیپیدهای حاوی زنجیرهای هیدروکربنی بلند، به‌راحتی به‌صورت تک ملکول در آب پخش نمی‌شوند. اینها با یکدیگر تعامل نموده تا ملکول‌های آب قطبی را دور کنند (ص ۶۲۷).

الکترولیت‌ها: تفکیک ملکول‌ها در آب

ملکول‌هایی که در آب تفکیک می‌شوند، تولید **کاتیون** (یون‌های دارای مثبت) و **آنیون** (یون‌های دارای بار منفی) می‌کنند. اینها را تحت عنوان **الکترولیت‌ها** طبقه‌بندی می‌کنند، زیرا یون‌ها سبب تسهیل هدایت یک جریان الکتریکی می‌شوند. قندها و الکل‌ها **غیرالکترولیت** هستند، زیرا به‌راحتی در آب حل می‌شوند، ولی بار را هدایت نمی‌کنند و به گونه‌های باردار تفکیک نمی‌شوند.

در زمان انحلال در آب، املاح فلزات قلیایی (نظیر Li، Na و K) و اسیدهایی نظیر اسید کلریدریک و اسید سولفوریک در غلظت‌های پایین، و نه لزوماً در غلظت‌های بالا، به‌طور کامل تفکیک می‌شوند. در سیستم‌های بیولوژیکی و به‌دلیل داشتن غلظت‌های پایین، این ترکیبات و همچنین املاح اسیدهای آلی را کاملاً تفکیک‌شده در نظر می‌گیرند. در صورتی‌که یک محلول حاوی املاح متفاوتی (برای مثال، NaCl و K_2SO_4) باشد، این ملکول‌ها به این شکل در محلول وجود نخواهد داشت، بلکه تنها به‌شکل یون‌های تفکیک‌شده (برای مثال، Na^+، K^+ و SO_4^{2-}) وجود خواهند داشت. املاحی که کاملاً تفکیک می‌شوند را **الکترولیت‌های قوی** می‌نامند. در آب، آنیون‌های تفکیک‌شده از املاح آلی تا حدودی با پروتون‌های آزاد (H^+) حاصل از تفکیک آب واکنش نموده تا تولید اسید تفکیک‌نشده می‌کنند (شکل ۵-۱).

(1) $CH_3-CHOH-CHOONa \longrightarrow$
Na lactate
$Na^+ + CH_3-CHOH-COO^-$
Lactate ion

(2) $CH_3-CHOH-COO^- + H^+ \rightleftharpoons$
Lactate ion
$CH_3-CHOH-COOH$
Lactic acid

شکل ۵-۱ واکنش‌هایی که در هنگام تفکیک لاکتات سدیم در آب رخ می‌دهند.

برخلاف املاح، بسیاری از اسیدها وقتی در آب حل می‌شوند، کاملاً تفکیک نمی‌گردند، بلکه تعادلی را بین اجزاء تفکیک‌نشده و تفکیک‌شده به‌وجود می‌آورند. بر همین اساس، اسید لاکتیک که یکی از ترکیبات واسط متابولیکی مهم است، به صورت زیر تا حدودی به آنیون لاکتات و یک پروتون تفکیک می‌شود:

$$CH_3-CHOH-COOH \rightleftharpoons CH_3-CHOH-COO^- + H^+$$

1. Amphipathic

یک تعادل پویا حاصل می‌شود که در آن محصولات واکنش دوباره واکنشگر تفکیک‌نشده را تولید می‌کنند، در حالی‌که ملکول‌های دیگر تفکیک می‌شوند. شدت تفکیک چنین الکترولیتی وابسته به تمایل آنیون برای H^+ می‌باشد. این ترکیبات که **الکترولیت‌های ضعیف** نامیده می‌شوند، در مقایسه با آنهایی که به‌طور کامل تفکیک می‌شوند، از نظر مولی ظرفیت کمتری در حمل بار الکتریکی دارند.

در تفکیک نسبی یک الکترولیت ضعیف که با **HA** نشان داده می‌شود، غلظت گونه‌های مختلف را می‌توان با استفاده از معادله زیر تعیین نمود

$$K'_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \qquad (۱-۱)$$

که در آن K'_{eq} یک ثابت فیزیکی است، A^- اشاره به آنیون تفکیک‌شده دارد، و کروشه‌ها غلظت هر جزء با واحدی نظیر مول در لیتر (mol/L یا M) یا میلی‌مول در لیتر (millimol/L یا mM) را نشان می‌دهد. بهتر است به‌جای غلظت، از **فعالیت** هرگونه در این معادله تعادلی استفاده شود، ولی از آنجایی که اکثر ترکیبات مورد نظر در سیستم‌های بیولوژیکی با غلظت پایینی وجود دارند، میزان فعالیت به میزان غلظت نزدیک است. هر چند، ثابت تعادل به صورت K'_{eq} ذکر می‌شود تا ثابت ظاهری براساس غلظت را نشان دهد. از آنجایی‌که تفکیک یک اسید با افزایش درجه حرارت زیاد می‌شود، K'_{eq} نیز افزایش خواهد یافت.

براساس معادله تفکیک می‌توان دریافت که وقتی شدت تفکیک یک ماده کم است (مخرج بزرگ در معادله ۱-۱)، آنگاه K'_{eq} نیز عدد کوچکی خواهد بود؛ برعکس، با شدت بالای تفکیک این میزان بزرگ (مخرج کوچک) می‌باشد. برای الکترولیت‌های قوی نمی‌توان K'_{eq} را تعیین نمود، زیرا در حالت تعادل ماده تفکیک‌نشده‌ای باقی نمی‌ماند.

آب یک الکترولیت ضعیف است

آب به صورت زیر تفکیک می‌شود:

$$HOH \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

پروتون‌هایی که تفکیک می‌شوند، با اکسیژن‌های مربوط به ملکول‌های آب دیگر تعامل نموده و تولید دستجاتی از ملکول‌های آب به‌صورت $H^+(H_2O)_n$ می‌کنند که در آن n از ۶ تا ۲۷ تعیین شده است. این هیدراتاسیون H^+ اغلب به‌شکل H_3O^+ یا **یون هیدرونیوم** نمایش داده می‌شود. هرچند آن چیزی که در عمل بیشتر مورد قبول است و در این کتاب نیز انتخاب شده است، نمایش پروتون به‌صورت H^+، به‌جای H_3O^+، می‌باشد. در ۲۵°C میزان K'_{eq} برای تفکیک آب حدود $۱٫۸\times۱۰^{-۱۶}$ می‌باشد.

$$K'_{eq} = ۱٫۸\times۱۰^{-۱۶} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \qquad (۱-۲)$$

با چنین K'_{eq} کوچکی، واقعاً تعداد فوق‌العاده کوچکی از ملکول‌های آب نسبت به تعداد ملکول‌های تفکیک‌نشده، تفکیک می‌شوند. با این تفکیک بسیار کوچک، غلظت آب که برابر ۵۵٫۵ M می‌باشد، اساساً بدون تغییر مانده و ثابت در نظر گرفته می‌شود. لذا معادله ۲-۱ را می‌توان به‌صورت زیر نوشت:

$$K'_{eq} \times [H_2O] = [H^+][OH] \qquad (۱-۳)$$

$K'_{eq} \times [۵۵٫۵]$ ثابت است و **حاصلضرب یونی آب** گفته می‌شود. این میزان در ۲۵°C برابر ۱×۱۰^{-۱۴} می‌باشد. در آب خالص، غلظت H^+ برابر OH^- است و با قراردادن $[H^+]$ به‌جای $[OH^-]$ در معادله ۳-۱، $[H^+]$ برابر ۱×۱۰^{-۷} M می‌شود. بدون توجه به مواد حل‌شده، همواره واکنش تعادلی H_2O، H^+ و OH^- در محلول‌های آبی وجود دارد. در صورت افزایش $[H^+]$ که با افزودن یک اسید رخ می‌دهد، برای تضمین ارتباط تعادلی آب لازم است کاهشی در $[OH^-]$ رخ دهد. به‌طور مشابه، با افزایش $[OH^-]$، میزان $[H^+]$ کاهش خواهد یافت. در صورت دانستن غلظت یک یون، با استفاده از معادله حاصلضرب یونی، $[H^+]$ یا $[OH^-]$ را می‌توان محاسبه نمود. اهمیت یون‌های هیدروژنی در سیستم‌های بیولوژیک در بحث فعالیت آنزیمی (ص ۵۲۴) و متابولیسم نمایان خواهد شد.

۱-۳ • pH، اسیدهای ضعیف، و مزدوج‌های آنها

برای راحتی، معمولاً $[H^+]$ برحسب pH بیان می‌شود که تعریف آن به صورت زیر است

$$pH = \log\frac{1}{[H^+]} \qquad (۱-۴)$$

در آب خالص $[H^+]$ و $[OH^-]$ هر دو ۱×۱۰^{-۷} M و pH برابر ۷٫۰ است. $[OH^-]$ را نیز می‌توان به صورت pOH بیان نمود که در آب خالص میزان آن ۷ می‌باشد. برای معادله بیان‌کننده تفکیک آب، $[H^+][OH^-]=۱\times۱۰^{-۱۴}$؛ با گرفتن منفی لگاریتم هر دو سمت، این معادله به صورت pH + pOH = ۱۴ خواهد داشت. جدول ۱-۱ ارتباط بین pH و $[H^+]$ را نشان می‌دهد.

مقادیر pH مایعات بیولوژیکی مختلف در جدول ۲-۱ آورده شده است. در پلاسمای خون، $[H^+]$ برابر ۰٫۰۰۰۰۰۰۰۴ M یا pH برابر ۷٫۴ می‌باشد. غلظت کاتیون‌های دیگری نظیر Na^+ و K^+ بین ۰٫۰۰۱ و ۰٫۱۰ M می‌باشد که به‌خوبی بیش از ۱۰٫۰۰۰ برابر $[H^+]$ است. اهمیت تغییرات pH خون در ارتباط بالینی ۱-۱ شرح داده شده است.

در بررسی سیستم‌های بیولوژیکی استفاده از تعاریف یک اسید به‌عنوان **دهنده پروتون** و یک باز به‌عنوان **پذیرنده پروتون** که توسط لوری[1] و برونشتد[2] مطرح شد، مناسب است.

جدول ۱-۱ • ارتباطات بین $[H^+]$، pH، $[OH^-]$ و pOH

$[H^+](M)$	pH	$[OH^-](M)$	pOH
۱٫۰	۰	۱×۱۰^{-۱۴}	۱۴
۰٫۱(۱×۱۰^{-۱})	۱	۱×۱۰^{-۱۳}	۱۳
۱×۱۰^{-۲}	۲	۱×۱۰^{-۱۲}	۱۲
۱×۱۰^{-۳}	۳	۱×۱۰^{-۱۱}	۱۱
۱×۱۰^{-۴}	۴	۱×۱۰^{-۱۰}	۱۰
۱×۱۰^{-۵}	۵	۱×۱۰^{-۹}	۹
۱×۱۰^{-۶}	۶	۱×۱۰^{-۸}	۸
۱×۱۰^{-۷}	۷	۱×۱۰^{-۷}	۷
۱×۱۰^{-۸}	۸	۱×۱۰^{-۶}	۶
۱×۱۰^{-۹}	۹	۱×۱۰^{-۵}	۵
۱×۱۰^{-۱۰}	۱۰	۱×۱۰^{-۴}	۴
۱×۱۰^{-۱۱}	۱۱	۱×۱۰^{-۳}	۳
۱×۱۰^{-۱۲}	۱۲	۱×۱۰^{-۲}	۲
۱×۱۰^{-۱۳}	۱۳	۰٫۱(۱×۱۰^{-۱})	۱
۱×۱۰^{-۱۴}	۱۴	۱٫۰	۰

1. Lowry
2. Bronsted

ارتباط بالینی ۱-۱

شرایط پزشکی غیرطبیعی که با تغییرات pH خون همراه هستند

در پستانداران، میزان pH محیط‌های آبی داخل و خارج سلولی در یک حالت پایدار پویا قرار دارد که در آن تغییر یک محیط منجر به ایجاد تغییراتی در محیط‌های دیگر می‌شود. pH خون انعکاسی از pH بافت‌ها است و میزان pH کمتر یا بیشتر از دامنه طبیعی ۷٫۳۵ تا ۷٫۴۵ یک حالت بالقوه پاتولوژیک را نشان می‌دهد. مقادیر pH خون کمتر از ۷٫۰ (H^+ = ۰٫۰۰۰۰۰۰۱M) یا بیش از ۷٫۸ (H^+ = ۰٫۰۰۰۰۰۰۰۱۶)، برای ادامه زندگی خطرناک است و نیاز به مداخله پزشکی دارد. شرایط پزشکی متعددی می‌توانند سبب ایجاد تغییراتی در pH خون نسبت به حالت طبیعی شوند. در صورتی که pH خون کمتر از ۷٫۳۵ باشد، حالت ایجاد شده را **اسیدوز** و وقتی این میزان بیش از ۷٫۴۵ است، آن را **آلکالوز** می‌نامند. براساس منبع افزایش اسید یا باز، یعنی به‌دلیل یک تغییر متابولیکی یا تنفسی، حالات اسیدوز یا آلکالوز به زیرنوع‌هایی طبقه‌بندی می‌شوند.

یک **اسیدوز متابولیک** می‌تواند به‌دلیل افزایش تولید اسیدهای آلی (برای مثال، اسید لاکتیک یا اجسام کتونی [ص۹۴۰]) یا دفع HCO_3^- از بدن باشد. تولید بیش از حد اسید می‌تواند در دیابت، هیپوکسمی (یعنی، افزایش تولید اسید لاکتیک در دونده‌های مسافت-طولانی)، و متابولیسم گزنوبیوتیک‌های تولیدکننده-اسید رخ دهد. دفع HCO_3^- که تعادل اسید و باز را برهم می‌زند، می‌تواند در نتیجه اسهال شدید، اورمی و بیماری‌های کلیوی مزمن رخ دهد. **اسیدوز تنفسی** در هنگام احتباس CO_2، شکل انیدرید H_2CO_3، در شرایط محدودیت دفع ریوی CO_2 نظیر موارد تجمع مایعات در ریه‌ها در نتیجه شرایطی نظیر آمفیزم یا آسم، محدودیت تنفسی مثلاً به‌دنبال تروما، پولیومیلیت و چاقی شدید رخ دهد.

علل اصلی **آلکالوز متابولیک** شامل احتباس HCO_3^- و خوردن باز می‌باشند. **آلکالوز تنفسی** در نتیجه کاهش تهویه به‌دلیل هیستری، دوز بیش از حد داروها (برای مثال، سالیسیلات‌ها) و تب حادث می‌شود.

اندازه‌گیری pH خون برای پایش وضعیت اسید- باز در بسیاری از بیماری‌ها معمول است، زیرا کاهش یا افزایش کنترل‌نشده pH خون می‌تواند عوارض سریع و شدیدی را به‌دنبال داشته باشد.

جدول ۲-۱ • pH برخی مایعات بیولوژیک

مایع	*pH*
پلاسمای خون	۷٫۴
مایع بینابینی	۷٫۴
مایع داخل سلولی	
سیتوزول (کبد)	۶٫۹
ماتریکس لیزوزومی	زیر ۵٫۰
شیره معده	۱٫۵-۳٫۰
شیره پانکراس	۷٫۸-۸٫۰
شیر انسان	۷٫۴
بزاق	۶٫۴-۷٫۰
ادرار	۵٫۰-۸٫۰

HCl و H_2SO_4 به‌عنوان اسیدهای قوی تعریف می‌شوند، زیرا به‌طور کامل تفکیک شده و پروتون آزاد می‌کنند. OH^- یک باز قوی است، زیرا براحتی به پروتون‌های موجود پیوسته و تولید H_2O می‌کند. افزودن یک اسید یا یک باز به آب منجر به ایجاد تعادل جدیدی از $OH^- + H^+ \rightleftharpoons H_2O$ می‌شود. وقتی یک باز قوی و OH^- ترکیب می‌شوند، H^+ حاصل از اسید و OH^- اساساً به‌طور کامل با یکدیگر تعامل نموده و یکدیگر را خنثی می‌کنند. آنیون‌های تولیدی در هنگام تفکیک اسیدها، نظیر Cl^- از HCl، باز نیستند، زیرا در محلول رقیق دوباره با پروتون‌ها ترکیب نمی‌شوند.

بیشتر اسیدهای آلی موجود در سیستم‌های بیولوژیکی به‌طور نسبی تفکیک شده و به‌عنوان **اسیدهای ضعیف** طبقه‌بندی می‌شوند. آنها تعادلی را به صورت زیر بین HA (دهنده پروتون)، یک آنیون (A^-) اسید تفکیک‌شده، و (H^+) به‌وجود می‌آورند:

$$HA \rightleftharpoons A^- + H^+$$

آنیون تولیدی در این تفکیک، یک باز است زیرا می‌تواند یک پروتون دریافت نموده و مجدداً تولید اسید کند. یک اسید ضعیف و باز (آنیون) آن که در اثر تفکیک حاصل می‌شود را **جفت مزدوج**[1] گویند. برخی جفت‌های مزدوج مهم بیولوژیکی در جدول ۳-۱ آورده شده‌اند. یون

1. Conjugate pair

جدول ۳-۱ • برخی جفت‌های اسید - باز مزدوج مهم در سیستم‌های بیولوژیکی

دهنده پروتون (اسید)		پذیرنده پروتون (باز)
$CH_3-CHOH-COOH$ (lactic acid)	$\rightleftharpoons$	$H^+ + CH_3-CHOH-COO^-$ (lactate)
$CH_3-CO-COOH$ (pyruvic acid)	$\rightleftharpoons$	$H^+ + CH_3-CO-COO^-$ (pyruvate)
$HOOC-CH_2-CH_2-COOH$ (succinic acid)	$\rightleftharpoons$	$2H^+ + {}^-OOC-CH_2-CH_2-COO^-$ (Succinate)
$^+H_3NCH_2-COOH$ (glycine)	$\rightleftharpoons$	$H^+ + {}^+H_3N-CH_2-COO^-$ (glycinate)
H_3PO_4	$\rightleftharpoons$	$H^+ + H_2PO_4^-$
$H_2PO_4^-$	$\rightleftharpoons$	$H^+ + HPO_4^{2-}$
HPO_4^{2-}	$\rightleftharpoons$	$H^+ + PO_4^{3-}$
Glucose $6-PO_3H^-$	$\rightleftharpoons$	$H^+ +$ glucose $6-PO_3^{2-}$
H_2CO_3	$\rightleftharpoons$	$H^+ + HCO_3^-$
NH_4^+	$\rightleftharpoons$	$H^+ + NH_3$
H_2O	$\rightleftharpoons$	$H^+ + OH^-$

آمونیوم (NH_4^+) یک اسید ضعیف است، زیرا تفکیک شده و تولید H^+ و آمونیاک بدون بار (NH_3)، یک باز مزدوج، می‌کند. اسید فسفریک (H_3PO_4) یک اسید و PO_4^{3-} یک باز است، در حالی که H_2PO^- و HPO_4^{2-}، برحسب این که این گروه فسفات دهنده یا پذیرنده پروتون است، می‌تواند اسید یا باز باشد.

تمایل اسید مزدوج در آزادسازی H^+ را می‌توان از K'_{eq} (معادله ۱-۱) برآورد نمود. هر چه میزان K'_{eq} کمتر باشد، تمایل به دادن پروتون کمتر بوده و اسید ضعیف‌تر است. هر چه میزان K'_{eq} بزرگتر می‌باشد، تمایل برای تفکیک زیادتر بوده و اسید قوی‌تر می‌باشد. آب اسید بسیار ضعیفی با K'_{eq} برابر $۱{,}۸\times۱۰^{-۱۶}$ در $۲۵°C$ می‌باشد.

روش مناسب بیان K'_{eq} به شکل K'_{eq} می‌باشد که به‌صورت زیر تعریف می‌شود:

$$pK' = \log \frac{1}{K'_{eq}} \qquad (۱-۵)$$

به شباهت این تعریف با تعریف pH توجه کنید؛ همانند pH و $[H^+]$، ارتباط بین K'_{eq} و pK' یک رابطه معکوس است و هر چه K'_{eq} کوچکتر باشد، pK' بزرگتر است. مقادیر نمونه K'_{eq} و pK' برای اسیدهای مزدوجی که در سیستم‌های بیولوژیکی مهم هستند، در جدول ۴-۱ فهرست شده‌اند. جزئیات سیستم **اسید کربنیک**/بیکربنات در یک نگاه دقیق‌تر ۱-۱ آورده شده است.

جدول ۴-۱ • ثابت تفکیک و pK′ ظاهری برخی ترکیبات مهم در بیوشیمی

ترکیب	ساختمان	$K'_{eq}(M)$	pK'
Acetic acid		$۱٫۷۴ \times ۱۰^{-۵}$	۴٫۷۶
Alanine		$۴٫۵۷ \times ۱۰^{-۳}$	۲٫۳۴ (COOH)
		$۲٫۰۴ \times ۱۰^{-۱۰}$	۹٫۶۹ (NH_3^+)
Citric acid		$۸٫۱۲ \times ۱۰^{-۴}$	۳٫۰۹
		$۱٫۷۷ \times ۱۰^{-۵}$	۳٫۷۴
		$۳٫۸۹ \times ۱۰^{-۶}$	۵٫۴۱
Glutamic acid		$۶٫۴۵ \times ۱۰^{-۳}$	۲٫۱۹ (COOH)
		$۵٫۶۲ \times ۱۰^{-۵}$	۴٫۲۵ (COOH)
		$۲٫۱۴ \times ۱۰^{-۱۰}$	۹٫۶۷ (NH_3^+)
Glycine		$۴٫۵۷ \times ۱۰^{-۳}$	۲٫۳۴ (COOH)
		$۲٫۵۱ \times ۱۰^{-۱۰}$	۹٫۶۰ (NH_3^+)
Lactic acid	$CH_3-CHOH-COOH$	$۱٫۳۸ \times ۱۰^{-۵}$	۳٫۸۶
Pyruvic acid	$CH_3-CO-COOH$	$۳٫۱۶ \times ۱۰^{-۳}$	۲٫۵۰
Succinic acid	$HOOC-CH_2-CH_2-COOH$	$۶٫۴۶ \times ۱۰^{-۵}$	۴٫۱۹
		$۳٫۳۱ \times ۱۰^{-۶}$	۵٫۴۸
Glucose $6-PO_3H^-$	$C_{12}H_{11}O_5PO_3H^-$	$۷٫۷۶ \times ۱۰^{-۷}$	۶٫۱۱
	H_3PO_4	۱×۱۰^{-۲}	۲٫۰
	$H_2PO_4^-$	$۲٫۰ \times ۱۰^{-۷}$	۶٫۷
HPO_4^{2-}		$۳٫۴ \times ۱۰^{-۱۳}$	۱۲٫۵
H_2CO_3		$۱٫۷۰ \times ۱۰^{-۴}$	۳٫۷۷
NH_4^+		$۵٫۶۲ \times ۱۰^{-۱۰}$	۹٫۲۵
H_2O		$۱٫۸ \times ۱۰^{-۱۶}$	۱۵٫۷۴

معادله هندرسن-هاسلباخ ارتباط بین pH غلظت‌های مربوط به اسید و باز مزدوج را تعریف می‌کند

تغییر در هر جزء یک واکنش تعادلی، تغییر همزمان در هر کدام از اجزاء دیگر را ضروری می‌کند. برای مثال، افزایش $[H^+]$ سبب کاهش باز مزدوج (برای مثال، یون لاکتات) همراه با افزایش معادل در **اسید مزدوج** (برای مثال، اسید لاکتیک) می‌شود. این ارتباط به شکل مناسبی با نوآرایی معادله تعادلی و حل معادله برای H^+ بیان می‌گردد که برای تفکیک زیر نشان داده شده است:

$$\text{Conjugate acid} \rightleftharpoons \text{conjugate base} + H^+$$

$$K'_{eq} = \frac{[H^+][\text{conjugate base}]}{[\text{conjugate acid}]} \qquad (۱-۶)$$

یک نگاه دقیق‌تر ۱-۱

اسید کربنیک (H_2CO_3) یک اسید ضعیف مهم در هومئوستاز حیوانات است

اسید کربنیک (H_2CO_3) به‌عنوان یک اسید ضعیف، در کنترل pH در پستانداران بسیار مهم است. CO_2 دائماً طی واکنش‌های کاتابولیکی در بافت‌ها تولید می‌شود و از طریق ریه‌ها به‌داخل هوای بازدمی دفع می‌گردد. اندازه‌گیری میزان CO_2 خون در تعیین وضعیت اسید/باز بیمار مهم است. در حالت بالینی که محدودیت دفع CO_2 از بدن وجود دارد، H_2CO_3 تجمع‌یافته و منجر به اسیدوز تنفسی می‌شود (ارتباط بالینی ۱-۱ را ببینید).

وقتی دی‌اکسید کربن در سیستم‌های آبی حل می‌شود، از واکنش تعادلی زیر پیروی می‌کند:

$$CO_2 + H_2O \overset{K'_2}{\rightleftharpoons} H_2CO_3 \overset{K'_1}{\rightleftharpoons} H^+ + HCO_3^-$$

pK'_1 اسید کربنیک برابر ۳٫۷۷ است که قابل قیاس با اسیدهای آلی نظیر اسید لاکتیک می‌باشد. معادله تعادلی این واکنش به‌صورت زیر است:

$$K'_1 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]} \qquad (۱)$$

هر چند، H_2CO_3 در تعادل با CO_2 حل شده می‌باشد و معادله تعادلی این واکنش به‌صورت زیر است:

$$K'_2 = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2][H_2O]} \qquad (۲)$$

با حل معادله (۲) برای H_2CO_3 و جایگزینی H_2CO_3 در معادله (۱)، این دو واکنش تعادلی را می‌توان به‌صورت یک معادله نوشت:

$$K'_1 = \frac{[H_1^+][HCO_3^-]}{K'_2[CO_2][H_2O]} \qquad (۳)$$

با جمع ثابت‌ها و در نظر گرفتن غلظت H_2O (۵۵٫۵ M)، معادله فوق ساده شده و یک ثابت ترکیبی '۳ به‌صورت زیر حاصل می‌شود:

$$K'_1K'_2[H_2O] = K'_3 = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[CO_2]} \qquad (۴)$$

در کاربردهای پزشکی معمولاً به CO_2 حل‌شده به‌عنوان اسید مزدوج اشاره می‌شود؛ CO_2 حل‌شده شکل انیدرید H_2CO_3 است. میزان K'_3 برابر $۷٫۹۵ \times ۱۰^{-۷}$ و میزان pK'_3 برابر ۶٫۱ است. در صورتی‌که سیستم آبی در تماس با فاز هوا باشد، CO_2 حل‌شده با CO_2 (حل‌شده) در فاز هوا در تعادل است. کاهش یا افزایش یک جزء- H_2CO_3، H^+، یا HCO_3^- منجر به تغییر در اجزاء دیگر می‌شود. سیستم CO_2/HCO_3^- در هومئوستاز pH در حیوانات فوق‌العاده مهم می‌باشد. CO_2 دائماً طی واکنش‌های کاتابولیکی در بافت‌ها تولید و از طریق ریه‌ها در هوای بازدمی دفع می‌شود. اسیدوز تنفسی می‌تواند حاد (نگه‌داشتن تنفس) یا مزمن (پنومونی) باشد.

با تقسیم معادله ۶-۱ بر $[H^+]$ و K'_{eq} داریم

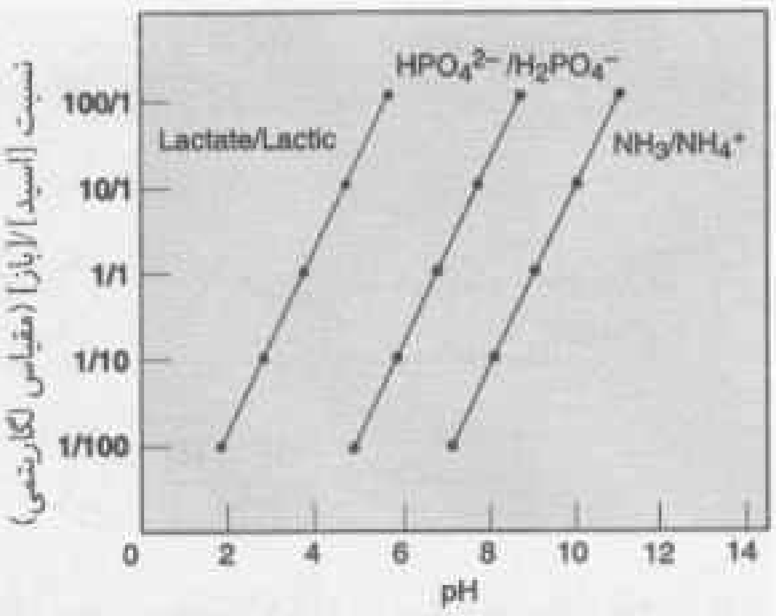
$$\frac{1}{[H^+]} = \frac{1}{[K'_{eq}]} \cdot \frac{[\text{conjugate base}]}{[\text{conjugate acid}]} \qquad (۱-۷)$$

از هر دو طرف لگاریتم می‌گیریم

$$\log\frac{1}{[H^+]} = \log\frac{1}{1K'_{eq}} + \log\frac{[\text{conjugate base}]}{[\text{conjugate acid}]} \qquad (۱-۸)$$

از آنجایی‌که $pH = \log ۱/[H^+]$ و $pK' = \log ۱/K'_{eq}$ است، معادله ۸-۱ به صورت زیر تغییر می‌کند:

$$pH = pK' + \log\frac{[\text{conjugate base}]}{[\text{conjugate acid}]} \qquad (۱-۹)$$



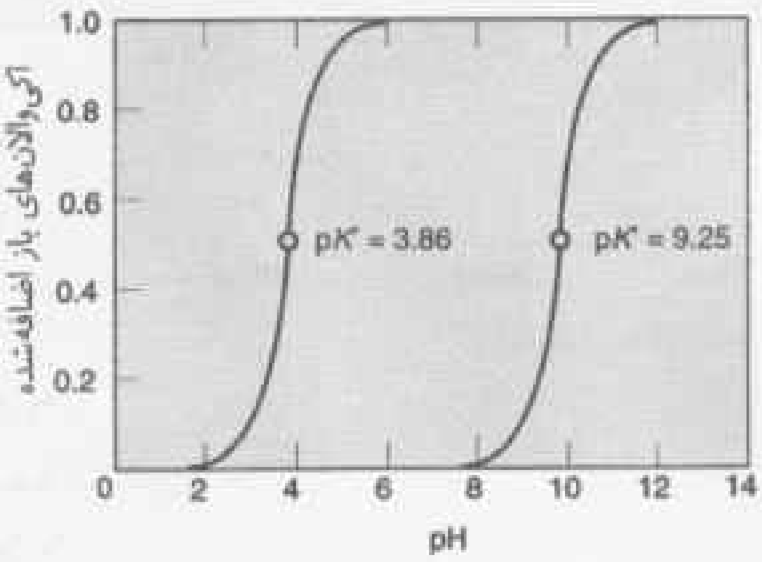
شکل ۶-۱ نسبت [اسید]/[باز] به‌عنوان مزدوج تابعی از pH. وقتی نسبت [باز] به [اسید] برابر ۱ است، pH برابر pK' اسید ضعیف می‌باشد.

معادله ۹-۱ را **معادله هندرسن-هاسلباخ**[1] گویند که راه مناسبی برای بررسی ارتباط بین pH یک محلول و مقادیر نسبی جفت‌های اسید و باز مزدوج مجزای موجود می‌باشد. با بررسی معادله ۹-۱ مشخص می‌گردد هر وقت نسبت غلظت باز به غلظت اسید ۱:۱ است، pH برابر pK' اسید می‌باشد، زیرا log ۱ برابر صفر است. در صورتی‌که pH یک واحد کمتر از pK' باشد، نسبت [اسید]/[باز] برابر ۱:۱۰ است، و اگر pH یک واحد بیشتر از pK' باشد، نسبت [اسید]/[باز] برابر ۱۰:۱ خواهد بود. شکل ۶-۱ نمودار نسبت‌های باز مزدوج به اسید مزوج را در مقابل pH چندین اسید ضعیف رسم کرده است؛ توجه داشته باشید که این نسبت‌ها در مقیاس لگاریتمی آورده شده‌اند.

بافری‌نمودن برای کنترل pH مهم است

وقتی NaOH به محلول یک اسید ضعیف اضافه شود، NaOH به‌طور کامل تفکیک شده و OH^- توسط H^+ حاصل از تفکیک نسبی اسید خنثی شده و تولید H_2O می‌کند. کاهش در $[H^+]$ سبب تفکیک بیشتر اسید می‌شود تا نیاز واکنش تعادلی به آن را برطرف کند. میزان اسید ضعیفی که تفکیک می‌شود بسیار نزدیک به OH^- اضافه‌شده می‌باشد که برابر در نظر گرفته می‌شود. لذا کاهش در غلظت اسید مزدوج معادل میزان باز مزدوج تولیدی است و نسبت [اسید مزدوج]/[باز مزدوج] اسید ضعیف تغییر می‌کند. این حوادث در منحنی‌های تیتراسیون دو اسید ضعیف در شکل ۷-۱ نشان داده شده است. وقتی ۰٫۵ اکی‌والان OH^- اضافه می‌شود، ۵۰٪ اسید ضعیف تفکیک شده و نسبت [باز]/[اسید] برابر ۱٫۰ می‌باشد؛ pH در این نقطه برابر pK' اسید است. اشکال مربوط به منحنی‌های تیتراسیون مجزا مشابه هستند، ولی به‌دلیل تفاوت در مقادیر pK'، موقعیت متفاوتی دارند. وقتی تنها ۰٫۱ اکی‌والان OH^- اضافه می‌شود، یک افزایش شدید در pH وجود دارد، ولی بین ۰٫۱ و ۰٫۹ اکی‌والان OH^- اضافه‌شده، تغییر pH تنها حدود ۲ واحد است. لذا میزان زیادی OH^- اضافه می‌شود، ولی تغییر در pH نسبتاً کوچک می‌باشد. این را **بافری‌شدن** گویند و به صورت توانایی یک محلول برای مقاومت در برابر تغییر pH در هنگام افزودن اسید یا باز تعریف می‌شود. در صورت عدم وجود اسید ضعیف، میزان کم OH^- منجر به تغییر تا یک میزان pH بالا می‌شود، زیرا منبع قابل‌توجهی برای H^+ وجود ندارد تا OH^- را خنثی کند.

بهترین دامنه بافری برای یک جفت مزدوج در pH نزدیک به pK' اسید ضعیف است. با شروع از pH یک واحد کمتر از و رفتن به میزان pH یک واحد بالاتر از pK'، حدود ۸۲٪ اسید ضعیف موجود در محلول تفکیک خواهد شد و بنابراین میزان اکی‌والان باز تا حدود ۸۲٪ اسید ابتدایی را می‌توان با یک تغییر pH به اندازه ۲ واحد، خنثی نمود. دامنه دارای بیشترین قدرت بافری جفت‌های مزدوج بین ۱ واحد pH زیر و ۱ واحد pH بالای pK' در نظر گرفته می‌شود. جفت مزدوج یون لاکتات و اسید لاکتیک با pK' برابر ۳٫۸۶ یک



شکل ۷-۱ منحنی تیتراسیون اسید-باز برای اسید لاکتیک (pK' ۳٫۸۶) و NH_4^+ (pK' ۹٫۲۵). در pH برابر مقادیر pK' مربوطه، مقادیر برابر باز و اسید برای هر جفت کونژوگه وجود خواهد داشت.

1. Henderson-Hasselbalch equation

بافر مؤثر بین pH برابر ۳ تا ۵ است و در pH برابر ۷٫۰ ظرفیت بافری آن قابل توجه نیست. جفت $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ با pK' برابر ۶٫۷، یک بافر مؤثر در $pH = ۷٫۰$ است. لذا در pH سیتوزولی سلول (حدود ۷٫۰)، جفت لاکتات-اسید لاکتیک بافر مؤثری نیست، ولی جفت $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ مؤثر است.

ظرفیت بافری نیز وابسته به غلظت اسید و باز مزدوج است. هر چه غلظت باز مزدوج بیشتر باشد، H^+ بیشتری اضافه شده که با آن می‌تواند واکنش کند. هر چه اسید مزدوج بیشتر باشد، OH^- بیشتری را می‌توان افزود تا با تفکیک اسید خنثی شود. pH پلاسمای خون ۷٫۴ می‌باشد. pK' برای $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ برابر ۶٫۷ مطرح می‌نماید که این جفت مزدوج یک بافر قابل توجه در پلاسما است. هر چند، غلظت جفت فسفات در مقایسه با سیستم HCO_3^-/CO_2 دارای pK' برابر ۶٫۱ که با غلظت ۲۰ برابر وجود دارد، کم می‌باشد. با وجود این که pK' سیستم HCO_3^-/CO_2 حدود ۱٫۳ واحد کمتر از pH پلاسمایی است، ولی این سیستم مسئول بیشترین ظرفیت بافری خون است. در هنگام در نظر گرفتن ظرفیت بافری، لازم است هم به pK' و هم غلظت یک جفت کونژوگه توجه شود. اکثر اسیدهای آلی، بافرهای نسبتاً بی‌اهمیتی در مایعات بدن هستند، زیرا pK' آنها بیش از چند واحد با pH سلول تفاوت دارد و غلظت آنها در مقایسه با سیستم‌های بافری نظیر - $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ و HCO_3^-/CO_2 بسیار پایین است.

یک نگاه دقیق‌تر ۲-۱

PH و مسائل بافری نمودن

۱. نسبت HPO_4^{2-} به $H_2PO_4^-$ $(pK' = ۶٫۷)$ را در مقادیر pH برابر ۵٫۷، ۶٫۷ و ۸٫۷ محاسبه کنید.

حل:

$$pH = pK' + \log\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

لگاریتم نسبت + ۶٫۷ = ۵٫۷

با جابه‌جایی داریم:

لگاریتم نسبت = ۱- = ۶٫۷ - ۵٫۷

آنتی‌لگاریتم ۱- برابر ۰٫۱ است. لذا در pH برابر ۵٫۷ نسبت $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ برابر ۱:۱۰ است. با همین روش، این نسبت در pH ۶٫۷ برابر ۱/۱ و در pH ۸٫۷ برابر ۱:۱۰۰ به‌دست می‌آید.

۲. در صورتی‌که pH خون برابر ۷٫۱ و غلظت HCO_3^- آن برابر 8mM باشد، غلظت CO_2 در خون چقدر است (pK' برای HCO_3^-/CO_2 برابر ۶٫۱ است)؟

حل:

$$pH = pK' + \log\frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

$$۷٫۱ = ۶٫۱ + \log\frac{8mM}{[CO_2]}$$

با جابه‌جایی داریم:

$$۷٫۱ - ۶٫۱ = ۱ = \log\frac{8mM}{[CO_2]}$$

آنتی‌لگاریتم ۱ برابر ۱۰ است. بنابراین، $\frac{۸mM}{[CO_2]} = ۱۰$ می‌باشد. با جابه‌جایی داریم:

$$[CO_2] = \frac{۸mM}{۱۰} = ۰٫۸mM$$

ارتباط بالینی ۲-۱

اهمیت HCO_3^- خونی در اسیدوز متابولیک

بافرهای موجود در خون، pH را در حدود ۷٫۴۰ حفظ می‌کنند. تولید سلولی اسیدها منجر به اسیدی‌شدن خون می‌شود که در آن H^+ توسط بازهای مختلف متعددی شامل HCP_3^-، هموگلوبین و HPO_4^{2-} بافری می‌شود. با مصرف بازها در فرایند بافری‌شدن، pH خون کاهش می‌یابد. در صورتی‌که تمامی بازها مصرف شوند، دیگر ظرفیت بافری وجود نخواهد داشت و pH شدیداً کاهش خواهد یافت. در اقدامات بالینی، مقادیر HCO_3^- و CO_2 و pH خون جهت تعیین وضعیت اسید- باز بیمار تعیین می‌شوند. در یک اسیدوز متابولیک که در آن pH خون کمتر از ۷٫۳۵ است (ارتباط بالینی ۱-۱ را ببینید)، پایش pH و همچنین ارزیابی میزان HCO_3^- باقیمانده برای بافری نمودن ادامه تولید اسید، مهم می‌باشد. با استفاده از معادله هندرسن- هاسلباخ، اگر دو متغیر را بدانیم، می‌توانیم سومی را محاسبه کنیم.

برای مثال، این مقادیر خونی را در یک بیمار مبتلا به اسیدوز متابولیک در نظر بگیریم: pH = ۷٫۰۳، و $[CO_2]$ = ۱٫۱ mM. میزان $[HCO_3^-]$ این بیمار چقدر است و چه میزان از $[HCO_3^-]$ طبیعی صرف بافری‌نمودن اسید ایجادکننده این وضعیت شده است؟

۱. معادله هندرسن-هاسلباخ به‌صورت زیر است:

$$pH = pK' + \log\frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

pK′ برای $[HCO_3^-]/[CO_2]$ برابر ۶٫۱۰ است.

۲. مقادیر را در داخل این معادله قرار می‌دهیم.

$$7.03 = 6.10 + \log\frac{[HCO_3^-]}{1.10\ \text{mM}}$$

یا

$$7.03 - 6.10 = 0.93 = \log\frac{[HCO_3^-]}{1.10\ \text{mM}}$$

آنتی‌لگاریتم ۰٫۹۳ برابر ۸٫۵ است؛ بنابراین،

$$8.5 = \frac{[HCO_3^-]}{1.10\ \text{mM}}$$

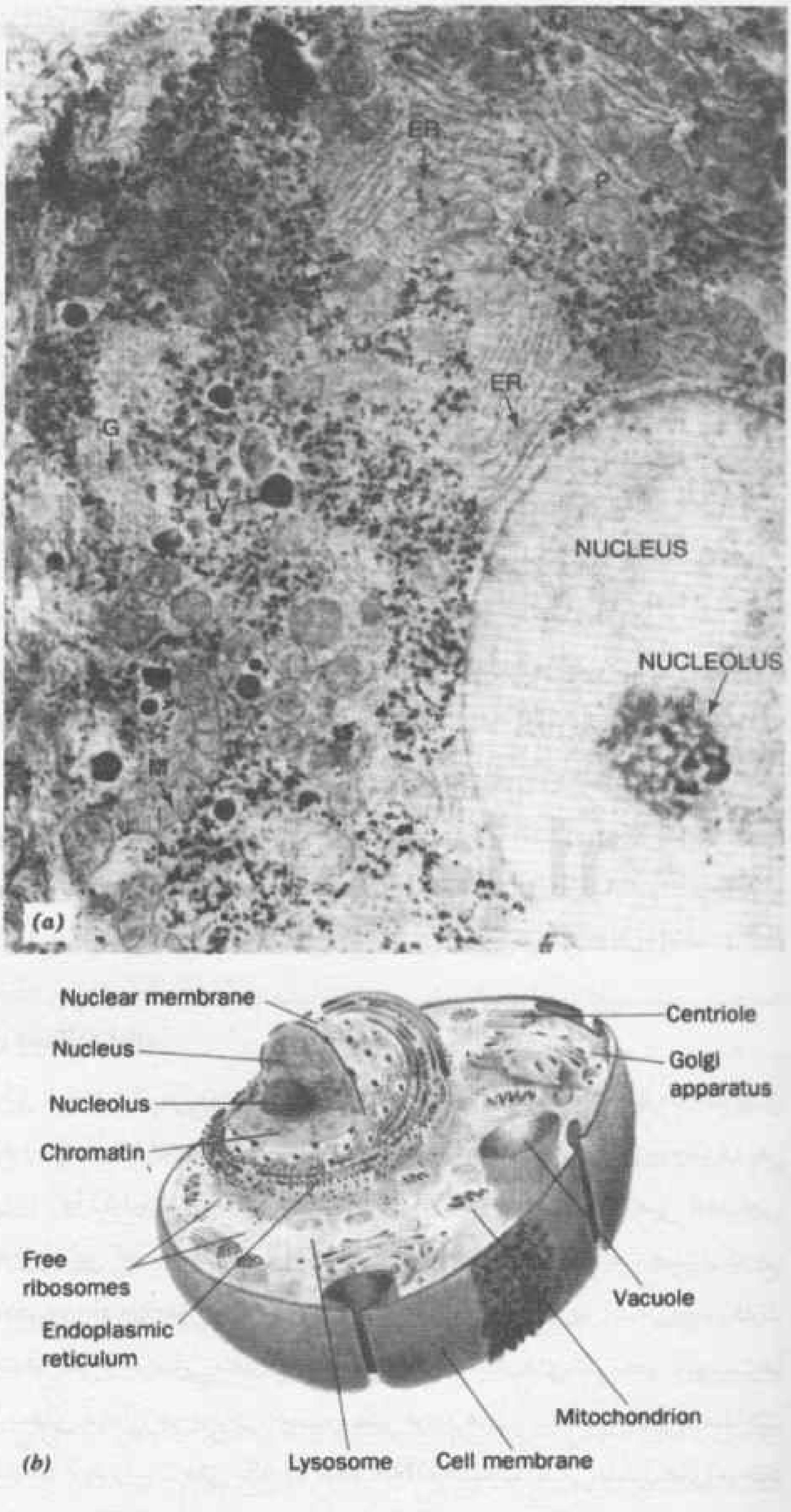
یا $[HCO_3^-]$ باقیمانده در خون برابر ۹٫۴ mM است.

۳. بنابراین، در هر لیتر خون میزان $[HCO_3^-]$ به اندازه ۱۴٫۶ mM کاهش یافته است. در صورتی‌که HCO_3^- بیشتری از دست برود، دیگر این بافر مهم برای بافری‌نمودن اسید اضافه‌شده در دسترس قرار نخواهد داشت که نتیجه آن سقوط سریع pH می‌باشد که به احتمال زیاد منجر به مرگ بیمار می‌شود.

یک مسئله متداول استفاده از معادله هندرسن- هاسلباخ در یک نگاه دقیق‌تر ۲-۱ آورده شده است. بیش از این نمی‌توان کنترل pH و بافری‌نمودن را در انسان مورد تأکید قرار داد. ارتباط بالینی ۲-۱ نمونه‌ای از مسائلی است که در موارد بالینی با آن برخورد می‌شود.

۱-۴ • اوکاریوت‌ها: سلول‌ها و بافت‌های پستانداران

سلول‌های اوکاریوتی حاوی ساختمان‌های تحت‌سلولی یا اندامک‌هایی نظیر **هسته**، **میتوکندری‌ها**، **لیزوزوم‌ها**، و **پراکسی‌زوم‌ها** هستند که هر کدام با استفاده از یک غشاء یک بخش درون‌سلولی را دربر گرفته‌اند (شکل ۸-۱). غشاءها همچنین یک شبکه لوله‌ای را در سرتاسر سلول، شامل **شبکه آندوپلاسمی** و **دستگاه گلژی**، به‌وجود می‌آورند که به ترتیب یک فضای مرتبط به هم یا سیسترنا را دربر می‌گیرند. ماهیت لیپید-پروتئینی تمامی غشاءهای سلولی (ص ۶۲۸) اجازه تبادل سریع ملکول‌های متعدد، شامل آب، از یک بخش سلولی به بخش دیگر را نمی‌دهد. مکانیسم‌های جابه‌جایی اختصاصی موجود در غشاءها، غلظت‌های مربوط به ملکول‌های کوچک و بزرگ، باردار یا بدون بار را در بخش‌های



شکل ۸-۱ **سلول پستانداران.** (a) میکروگراف الکترونی یک سلول کبدی موش صحرایی نشاندار شده است که اجزاء ساختمانی اصلی سلول‌های اوکاریوتی را نشان دهد. (b) نمایش شماتیکی از یک سلول حیوانی. به تعداد و انواع اندامک‌های تحت‌سلولی و شبکه غشاءهای متصل به یکدیگر احاطه‌کننده کانال‌ها و سیسترناها توجه کنید. تمامی سلول‌های اوکاریوتی به این اندازه ظاهر پیچیده‌ای ندارند، ولی اکثراً حاوی ساختمان‌های نشان داده شده هستند؛ ER، شبکه آندوپلاسمی؛ G، دستگاه گلژی؛ Ly، لیزوزوم؛ P، پراکسی‌زوم؛ و M، میتوکندری.

تحت‌سلولی مختلف کنترل می‌کنند. لذا ترکیب یون‌های معدنی، ملکول‌های آلی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک موجود در اندامک‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. پنهان‌سازی سوبستراها، کوفاکتورها و آنزیم‌های اختصاصی در فضاهای احاطه‌شده توسط غشاء، کارایی متابولیکی را افزایش می‌دهد و امکان شدت بیشتر کنترل فرایندهای بیولوژیکی را فراهم می‌سازد.

ترکیب شیمیایی، فعالیت‌ها، و وظایف بخش‌های سلولی مختلف با استفاده از تکنیک‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. برای سلول‌های سالم، از روش‌های رنگ‌آمیزی هیستو-شیمیایی، ایمونولوژیکی و فلورسنت استفاده شده است. روش‌های مشاهده حوادث داخل سلولی در زمان واقعی و در سلول‌های زنده به‌کار گرفته شده‌اند. تغییرات pH و غلظت یون کلسیم سیتوپلاسمی با استفاده از نشانگرهای یونی-اختصاصی مطالعه شده‌اند. موقعیت سلولی پروتئین‌های اختصاصی توسط آنتی‌بادی‌های فلورسنت تأمین می‌شوند. اندامک‌ها، غشاءها و اجزاء متفاوت سیتوزول را می‌توان جدا و بعد از تخریب غشاء پلاسمایی مورد آزمایش قرار دارد. تکنیک‌های تخریب غشاء پلاسمایی شامل استفاده از شوک اسموتیک، دترژنت‌ها، یا هموژنیزاسیون بافت‌ها می‌باشند. در تکنیک اخیر، نیروهای برنده سبب تخریب غشاء پلاسمایی می‌شوند. سانتریفوژ تمایزی امکان جداسازی اجزاء سلولی به‌دلیل اختلافات موجود در اندازه و چگالی آنها را فراهم می‌سازد. به علاوه، اجزاء مربوط به اندامک‌هایی نظیر میتوکندری‌ها و پراکسی‌زوم‌ها را می‌توان بعد از تخریب غشاء اندامکی، جدا نمود.

به‌نظر می‌رسد که اکثر ساختمان‌ها و کسرهای سلولی جداشده، خصوصیات شیمیایی و بیولوژیکی ساختمان در محل[1] را حفظ می‌کنند. ولی سیستم‌های غشاء بیولوژیک در معرض آسیب، حتی تحت شرایط بسیار ملایم، قرار دارند و تغییر ترکیبات طی جداسازی رخ می‌دهد. آسیب به یک غشاء سبب تغییر خصوصیات نفوذپذیری و امکان انتقال موادی می‌شود که به‌طورطبیعی توسط سد غشایی دفع می‌شوند. به علاوه، بسیاری از پروتئین‌ها ارتباط سُستی با غشاءها دارند و براحتی جدا می‌شوند (ص ۶۳۶).

سلول‌های پستانداران

پستانداران یکی از پیچیده‌ترین موجودات پرسلولی هستند؛ در این کلاس مهره‌داران، بیش از ۵۴۰۰ گونه وجود دارند. اینها نه تنها چندسلولی هستند، بلکه سلول‌های موجود در هر دستگاه عضوی آنها (کبد، کلیه، مغز، و غیره) برای انجام وظایف اختصاصی تخصص یافته‌اند. بسیاری از این اعضاء متشکل از تعدادی از انواع سلول‌های مختلف هستند که هر کدام نقش تخصص‌یافته‌ای دارند. بیش از ۲۰۰ نوع سلول مختلف در انسان وجود دارند که خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متفاوتی دارند. این دامنه از سلول‌های تکی نظیر لکوسیت‌ها در خون تا گروه‌های سلولی موجود در اعضاء، نظیر نورون‌ها در سیستم عصبی، متفاوت هستند. به استثناء اریتروسیت‌های بالغ که فاقد DNA هستند، تمامی سلول‌های موجود در یک فرد اطلاعات ژنتیکی مشابهی در DNA خود دارند. تنها اطلاعات مورد نیاز برای عمل یک سلول خاص بیان می‌شوند. در دوره بعد از لقاح یک تخم، برخی سلول‌ها را **سلول‌های بنیادی رویانی**[2] گویند که پتانسیل تولید تمامی سلول‌های هر عضوی در انسان بالغ را دارند. اینها **سلول‌های پلوری‌پوتنت**[3] هستند. بافت‌های تمایزیافته[4] حاوی

1. In situ 2. Embryonic stem cell 3. Pluripotent cells 4. Differentiated

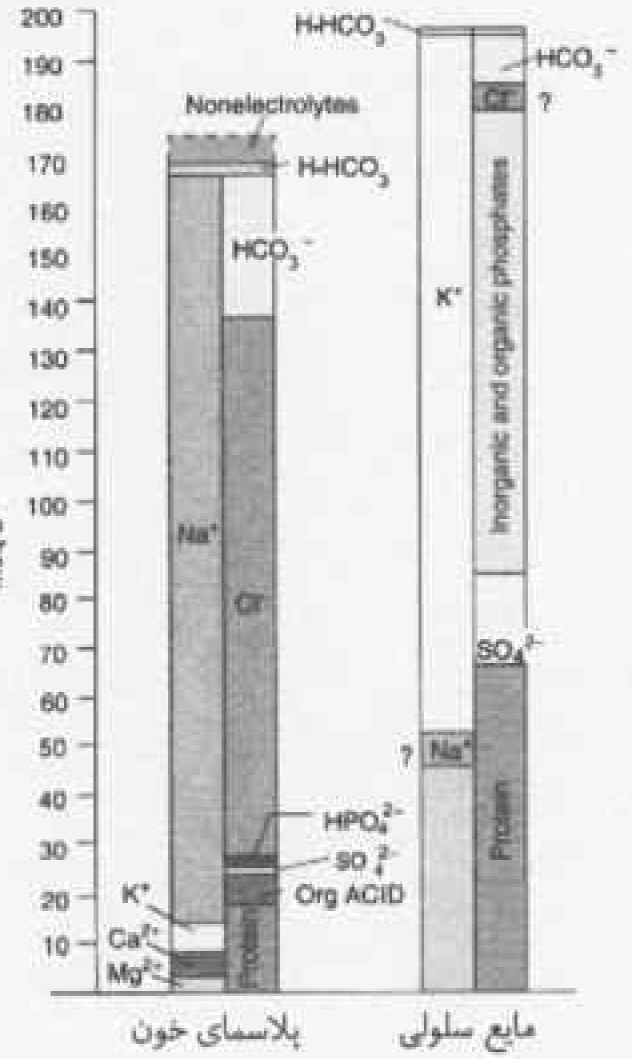
سلول‌های مولتی‌پوتنت[1] هستند که می‌توانند به تعداد محدودی سلول متفاوت تمایز یابند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ژنوم سلول‌های تمایزیافته می‌توانند دوباره برنامه‌ریزی‌شده تا سلول‌های مولتی‌پوتنت یا پلوری‌پوتنت تولید کنند. لذا اطلاعات ژنتیکی مربوط به نمو[2] در سلول تمایزیافته به‌طور برگشت‌پذیری از دست نرفته، بلکه سرکوب شده است.

تمامی سلول‌های پستانداران بافت منشاء و شدت تخصص‌یافتن[3]، خصوصیات فیزیکی، شیمیایی، و بیوشیمیایی زیاد مشترکی دارند. فعالیت‌ها و اجزاء سلول‌های یک عضو از یک گونه پستانداران مشابه، اگر نه یکسان با، همان عضو در برخی گونه‌های دیگر می‌باشد. در داخل یک پستاندار، نظیر انسان، همان پروتئین یا آنزیمی وجود دارد که در سلول‌های مربوط به انواع مختلف متعدد سلولی (برای مثال، عضله و کبد) وجود دارد، ولی اغلب تفاوت‌های برجسته‌ای از نظر کمّیت (برای مثال، غلظت) وجود دارد. یک مسیر متابولیکی ممکن است در یک سلول بسیار مهم باشد، ولی در سلول دیگر زیاد مهم نباشد. این تفاوت‌ها ناشی از تنوع‌های موجود در نیازهای مربوط به سلول‌های تخصص‌یافته مجزا می‌باشد؛ این تفاوت‌ها تحت کنترل بیان ژنوم در انواع مختلف سلول‌ها است.

تمامی اجزاء سلول‌ها در تعادل پویایی از سنتز و تخریب قرار دارند که یک غلظت سلولی حالت پایه از این مواد را به‌وجود می‌آورد. این حالت پویا بین انواع مختلف سلول‌های پستانداران متفاوت است. مسیرهای **کاتابولیک** (تخریبی) و **آنابولیک** (سنتتیک) تنظیم شده تا تعادل مناسب ترکیبات شیمیایی و محصولات را حفظ کنند. در بسیاری از موارد، کنترل از طریق پیام‌های شیمیایی صورت می‌پذیرد که در داخل سلول تولید می‌شوند. پستانداران همچنین سیستم‌های پیام‌رسانی شیمیایی پیچیده و یکپارچه‌ای را برای انتقال اطلاعات بین انواع سلول‌های مختلف دارند (ص ۶۸۰). این مسیرها شامل سنتز و آزادسازی ملکول‌های پیام از یک نوع سلول، انتقال آن به سیستم عضوی دیگر، و شناسایی اختصاصی پیام اولیه توسط سلول‌های هدف می‌باشد. در اکثر موارد، ملکول پیام بر روی تمامی انواع سلول‌ها اثر می‌کنند. به‌عنوان نمونه می‌توان به نقش هورمون‌های (برای مثال، انسولین) تولیدی توسط سلول‌های سیستم آندوکرین برای تغییر متابولیسم گلوکز در سیستم عضلانی اشاره کرد.

همان‌طور که اشاره شد، تفاوت اصلی بین پروکاریوت‌ها و اوکاریوت‌ها، وجود سیستم‌های غشایی داخل‌سلولی و اندامک‌ها در اوکاریوت‌ها است. این امکانات سطح دیگری را برای تسهیل کنترل آنزیم کاتالیزکننده واکنش‌های شیمیایی فراهم می‌سازد. به‌عنوان مثال، با داشتن یک مسیر متابولیکی در داخل فضای سلولی کوچکتر یک اندامک (برای مثال، میتوکندری)، غلظت ترکیبات واسط شیمیایی را می‌توان به حداکثر رساند تا برون‌ده مسیر یا واکنش بهتر شود. در غیر این صورت، میزان کل واکنشگرها در یک سلول می‌بایست برای رسیدن به همان برون‌ده، بیشتر باشد.

1. Multipotent cells 2. Development 3. Specialization



شکل ۹-۱ اجزاء شیمیایی اصلی پلاسمای خون و مایع سلولی. ارتفاع نیمه چپ هر ستون اشاره به غلظت تام کاتیون‌ها دارد و نیمه‌راست مربوط به غلظت آنیون‌ها است. غلظت هر دو برحسب میلی‌اکی‌والان در لیتر (meq/L) مایع بیان شده است. توجه داشته باشید که میزان سدیم و کلر مایع سلولی مشخص نیست. احتمال دارد، حداقل در عضله، سیتوزول حاوی مقداری سدیم ولی بدون کلر باشد.

ترکیب شیمیایی سلول‌های پستانداران

اجزاء شیمیایی پایه سلول‌های بیولوژیک در جدول ۵-۱ فهرست شده‌اند. در انواع مختلف سلول‌ها، غلظت یون‌های معدنی داخل سلولی اساساً مشابه، ولی بسیار متفاوت از محیط‌های خارج سلولی هستند. در شکل ۹-۱، برآوردی از ترکیب یونی مایع داخل سلولی که اساساً مربوط به **سیتوزول** می‌باشد، با پلاسمای خون مقایسه شده است. حجم و شدت هیدراتاسیون سلول‌ها پویا است و بنابراین این غلظت‌ها تنها برآوردهایی از غلظت واقعی هستند. Na^+ کاتیون اصلی خارج سلولی با غلظت حدود ۱۴۰ meq/L (mM) است؛ Na^+ بسیار کمی در مایع داخل سلولی وجود دارد. K^+ کاتیون اصلی داخل سلولی است. Mg^{2+} در هر دو بخش خارج- و داخل‌سلولی با غلظت‌های بسیار کمتر از Na^+ و K^+ وجود دارد. آنیون‌های خارج سلولی اصلی شامل Cl^- و HCO_3^- و با مقادیر کمتری فسفات و سولفات می‌باشند. اکثر پروتئین‌ها در pH ۷٫۴ (ص ۱۱۵) بار منفی دارند و در pH مایعات بافتی آنیون هستند. آنیون‌های داخل‌سلولی اصلی شامل فسفات معدنی، فسفات‌های آلی و پروتئین‌ها می‌باشند. سایر آنیون‌ها و کاتیون‌های معدنی و آلی به مقادیر کمتر از meq/L وجود دارند. به استثناء تفاوت‌های بسیار کوچک حاصل از غشاءها و ایجاد پتانسیل غشایی، در مایعات مختلف میزان کل کاتیون‌ها و آنیون‌ها برابر است.

غلظت‌های داخل‌سلولی اکثر ملکول‌های دارای وزن ملکولی کوچک، نظیر قندها، اسیدهای آلی و آمینو اسیدها، و ترکیبات واسط فسفریله در دامنه ۱٫۰-۰٫۰۱ meq/L قرار دارند، ولی برخی به میزان قابل‌توجهی کمتر هستند. کوآنزیم‌ها، ملکول‌های آلی مورد نیاز برای فعالیت برخی آنزیم‌ها، در همان دامنه غلظتی وجود دارند. غلظت‌های کل سلولی سوبستراها برای آنزیم‌ها در مقایسه با یون‌های معدنی، نسبتاً پایین هستند؛ با این وجود، قرارگیری در اندامک‌های اختصاصی یا ریزمحیط‌های سلولی می‌تواند سبب افزایش قابل توجه غلظت آنها شود.

تعیین غلظت مولی پروتئین‌های خاص در سلول‌ها زیاد معنی‌دار نیست. در بسیار موارد، این پروتئین‌ها در ساختمان‌های اختصاصی و یا در ترکیب با سایر پروتئین‌ها در جهت تولید واحدهای وظیفه‌دار وجود دارند. پروتئین‌ها نقش ساختمانی، کاتالیتیک یا تنظیمی خاص خود را در یک بخش محدودشده انجام می‌دهند. جالب است که در پلاسمای خون هزاران پروتئین مجزا وجود دارد که غلظت آنها از حدود 10^{-3} M (آلبومین) تا 10^{-13} M (هورمون پاراتیروئید) متفات می‌باشد و برخی پروتئین‌ها حتی غلظت‌های کمتری دارند.

۵-۱ • عملکرد اندامک‌های تحت‌سلولی و سیستم‌های غشایی در سلول‌های اوکاریوتی

اندامک‌ها فعالیت‌های بسیار اختصاصی دارند و فعالیت‌های آنزیمی آنها به‌عنوان نشانگرهایی

برای اندامک در هنگام جداسازی می‌باشد. برخی مسیرهای متابولیکی در یک بخش سلولی قرار دارند. به‌عنوان مثال، چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک (ص ۷۴۷) کاملاً در داخل میتوکندری‌ها و گلیکولیز در سیتوزول (ص ۸۰۱) قرار دارد و همانندسازی تنها در هسته و میتوکندری‌ها انجام می‌شود. برخی مسیرها بین دو موقعیت تقسیم شده و ترکیبات واسط مسیر از یک بخش به بخش دیگر انتشار یافته و یا انتقال داده می‌شوند. آنزیم‌های سنتز هِم (ص ۱۰۶۰) در میتوکندری‌ها و سیتوزول قرار دارند.

خلاصه‌ای از عملکرد ساختمان‌های اصلی سلول‌های اوکاریوتی در جدول ۶-۱ آورده شده است و این ساختمان‌ها در شکل ۸-۱ نشان داده شده‌اند. با توانایی در غیرفعال‌سازی انتخابی یا حذف ژن‌های اختصاصی در حیوانات (ص ۴۰۰)، شرایط پاتولوژیکی و بیماری‌هایی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که اکثر اندامک‌ها و ساختمان سلولی را درگیر می‌کنند. با این وجود در بسیاری از موارد، جزئیات بیوشیمیایی حاصل از یک ژن تغییر یافته هنوز تعیین نشده است.

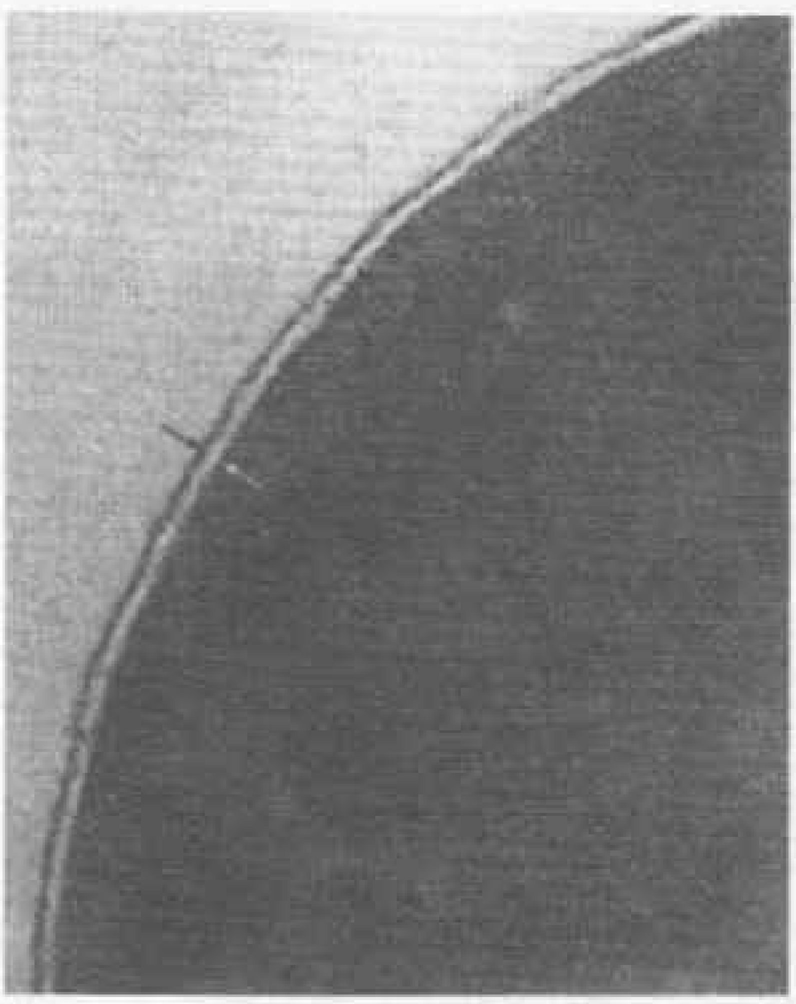
جدول ۵-۱ • اجزاء شیمیایی مربوط به سلول‌های بیولوژیک

جزء	دامنه وزن ملکولی
H_2O	۱۸
یون‌های معدنی Cl^-، K^+، Na^+، HPO_4^{2-}، SO_4^-، Mg^{2+}، Ca^{2+} و غیره	۲۳-۱۰۰
ملکول‌های آلی کوچک کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آلی، لیپیدها، نوکلئوتیدها، لیپیدها،	۱۰۰-۱۲۰۰
ماکروملکول‌ها پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای نوکلئیک	۶۰۰۰-۱۰۰۰ ۰۰۰

غشاء پلاسمایی مرز محدودکننده سلول است

سطح خارجی **غشاءهای پلاسمایی** (شکل ۱۰-۱) در تماس با محیط خارج‌سلولی متغیر و سطح داخلی آن در تماس با یک محیط نسبتاً ثابتی است که توسط سیتوپلاسم سلولی فراهم می‌گردد. ترکیب پروتئینی غشاءهای پلاسمایی بین انواع مختلف سلول‌ها متفاوت است، ولی اشتراکاتی در ترکیب لیپیدی وجود دارد. پروتئین‌ها و لیپیدها به‌طور تصادفی در سرتاسر غشاء منتشر نشده‌اند. دو سمت غشاءهای پلاسمایی پستانداران یک ترکیب لیپیدی مختلف دارند (ص ۶۳۱).

سطح خارجی از طریق **اینتگرین‌ها** تعاملات چسبنده‌ای را با ماتریکس سلولی و سلول‌ها به‌وجود می‌آورند. این پروتئین‌های عرض‌غشایی[1] به اسکلت سلولی موجود در داخل سلول اتصال یافته و در پیام‌رسانی دوجهته در عرض غشاء همکاری می‌کنند. غشاء پلاسمایی از طریق **عناصر اسکلت سلولی** در تعیین شکل و حرکت سلول همکاری می‌کند. ماهیت لیپیدی غشاءها مانع عبور بسیاری از مواد می‌شود، ولی مکانیسم‌های انتقالی یا منافذ اجازه حرکت عرض‌غشایی یون‌ها، ملکول‌های آلی، و آب را می‌دهند. ارتباطات بین‌سلولی از طریق وجود **گیرنده‌های پروتئینی** در سطح خارجی غشاء پلاسمایی برای اتصال به پیام‌های خارج سلولی نظیر هورمون‌ها و نوروترانسمیترها، به انجام می‌رسد. غشاء پلاسمایی با مواد سیتوپلاسمی مختلفی تعامل می‌کنند تا آندو- و اگزوسیتوز را انجام دهند. غیر از نقش در برداشت مایع خارج‌سلولی، **آندوسیتوز** نقش مهمی در مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، تحت عنوان آپوپتوز (ص ۱۳۴۲)، دارد. جزئیات ساختمان و بیوشیمی غشاء در فصل ۱۲ مورد بررسی قرار می‌گیرد.

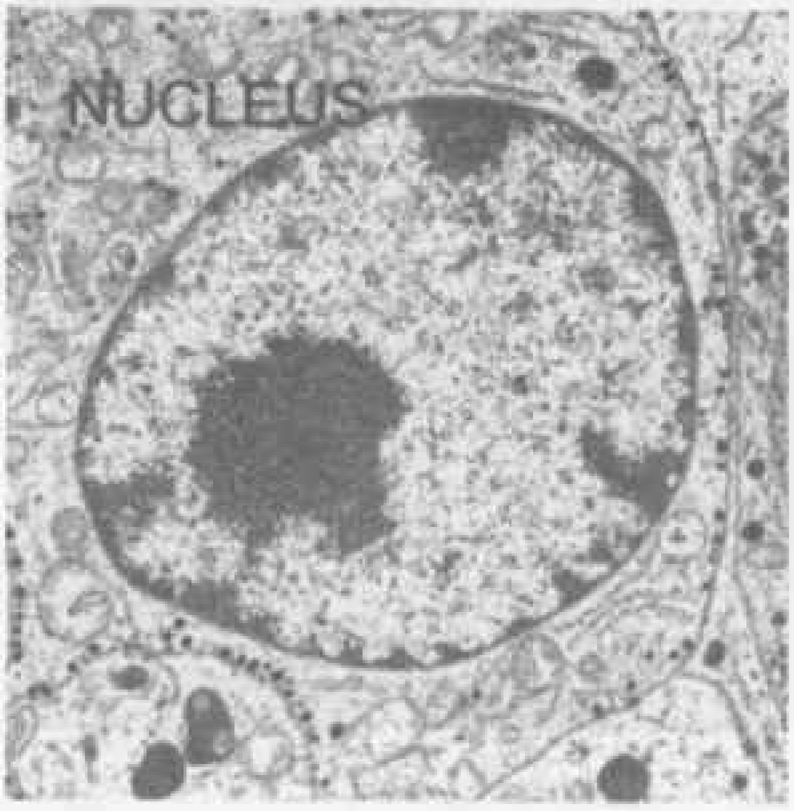


شکل ۱۰-۱ غشاء پلاسمایی یک سلول پستانداران. میکروگراف الکترونی غشاء پلاسمایی گلبول قرمز.

1. Transmembrane

جدول ۶-۱ • خلاصه اجزاء سلولی و فعالیت آنها

بخش	فعالیت‌های اصلی
غشاء پلاسمایی	انتقال یون‌ها و ملکول‌های کوچک اگزو- و آندو- سیتوز شناسایی سلول - سلول گیرنده‌هایی برای ملکول‌های بزرگ و کوچک
هسته	سنتز و ترمیم DNA سنتز RNA
هستک	سنتز و پردازش RNA ریبوزومی
شبکه آندوپلاسمی	سنتز غشاء سنتز پروتئین‌ها و لیپیدها برای برخی اندامک‌ها و برای انتقال به خارج سلول سنتز لیپید و استروئید واکنش‌های سم‌زدایی پیام‌رسانی Ca^{2+}
دستگاه گلژی	تغییر و دسته‌بندی پروتئین‌ها برای قرارگیری در داخل غشاءها و اندامک‌ها و برای انتقال به خارج سلول
میتوکندری‌ها	تولید ATP تنفس سلولی اکسیداسیون پیرووات، اسیدهای آمینه، و اسیدهای چرب سنتز هم و اوره
لیزوزوم‌ها	آپوپتوز هضم سلولی: هیدرولیز پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، و اسیدهای نوکلئیک
پراکسی‌زوم‌ها	اکسیداسیون لیپید واکنش‌های اکسیداتیو با استفاده از CO_2 مصرف H_2O_2
میکروتوبول‌ها، فیلمان‌های حدواسط، و میکروفیلمان‌ها	اسکلت سلولی مورفولوژی سلول حرکت سلولی حرکات داخل سلولی
سیتوزول	متابولیسم کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدها؛ سنتز اسیدهای چرب سنتز پروتئین



شکل ۱۱-۱ هسته یک سلول پستانداران.

هسته محل سنتز DNA و RNA است

هسته[1] (شکل ۱۱-۱) توسط دو غشاء، تحت عنوان **پوشش هسته**، احاطه شده است که غشاء خارجی آن در امتداد شبکه آندوپلاسمی قرار دارد. فضای بین این دو غشاء، یعنی **فضای بین‌غشایی**، در امتداد مجرای شبکه آندوپلاسمی است. پوشش هسته کمپلکس‌های چندپروتئینی متعددی، تحت عنوان کمپلکس‌های **منفذ هسته**، دارد که اتصال عرضی در

1. Nucleus

ارتباط بالینی ۳-۱

تسریع افزایش سن و هسته سلولی

سندروم پیری زودرس هاچینسون-گیلفورد[1] (HGPS) (OMIM ۱۷۶۶۷۰۰) یک حالت بسیار نادر است که در آن فرد مبتلا از زمان تولد سرعت بالای افزایش سن را نشان می‌دهد. برآورد می‌شود که این سندروم ۱ در ۴ تا ۸ میلیون تولد رخ دهد. این وضعیت در ابتدای زندگی با محدودیت رشد، کاهش مو، خصوصیات مربوط به صورت مشخص، اجسام شکننده کوچک، پوست چروکیده، آترواسکلروز، و مشکلات قلبی-عروقی که همگی در افراد مسن معمول هستند، تشخیص داده می‌شود. با این وجود، بیماران فاقد بیماری‌های نورودژنراتیو هستند. این بیماران به ندرت بیش از سنین ابتدایی جوانی زنده می‌مانند. فرایند افزایش سن این افراد با سرعت ۶ تا ۸ برابر سرعت طبیعی افزایش سن رخ می‌دهد.

در مبتلایان به HGPS یک تغییر ژنتیکی وجود دارد. به نظر می‌رسد پوشش هسته در این بیماران شکل طبیعی ندارد. لامینای A که یک پروتئین ساختمانی در هسته است، در سنتز هسته‌ای DNA و RNA نقش دارد. این پروتئین طی یک واکنش آنزیمی از یک پیش‌ساز متصل به غشاء هسته تولید می‌شود. مبتلایان به HGPS دچار کمبود این تبدیل هستند که نتیجه آن تجمع یک لامینای A غیرطبیعی در سلول‌های طبیعی با افزایش سن می‌باشد. وجود این پروتئین غیرطبیعی منجر به ایجاد حباب در هسته، تغییر بیان ژن و تداخل با میتوز می‌شود. در حال حاضر درمانی برای این وضعیت وجود ندارد، ولی با تعیین علت ایجادکننده این تغییرات، احتمال یافتن راه‌های درمانی وجود دارد. نتایج حاصل از مطالعات انجام‌شده بر روی HGPS همچنین می‌بایست منجر به روشن‌سازی جزئیات فرایند طبیعی افزایش سن شود.

1. Hutchinson-Gilford

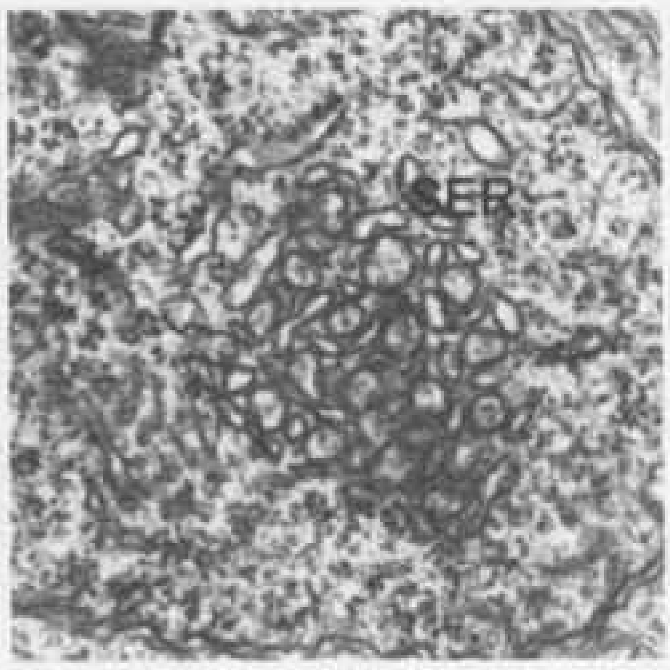
پوشش ایجاد کرده و منفذی با قطر متوسط حدود 90 Å دارد. این کمپلکس امکان کنترل حرکت ذرات و ملکول‌های بزرگ بین ماتریکس هسته و سیتوپلاسم را فراهم می‌سازد. انتقال ماکروملکول‌ها نیاز به صرف انرژی دارد و توسط مجموع متنوعی از پروتئین‌های بار و فاکتورهای انتقالی محلول که بین این دو بخش چرخش می‌کنند، تسهیل می‌شود. هم اکنون معتقدند پوشش هسته نقش‌های مهمی را غیر از فقط عمل به عنوان یک سد بین ماتریکس میتوکندری و سیتوپلاسم بازی می‌کند (ارتباط بالینی ۳-۱). همچنین زیربخش‌ها داخل هسته‌ای وجود دارند که مورد اصلی آن **هستک**[1] می‌باشد. یک ساختمان شبکه‌ای در زیر غشاء هسته‌ای داخلی، یعنی لامینای هسته، از ساختمان‌های هسته حمایت می‌کند.

اسید داکسی ریبونوکلئیک (DNA)، به عنوان ذخیره اطلاعات ژنتیکی، در هسته به صورت کمپلکس DNA-پروتئین، یعنی کروماتین، وجود دارد که به شکل کروموزوم‌های مجزا سازماندهی می‌شود. هسته حاوی پروتئین‌ها و آنزیم‌های مورد نیاز برای همانندسازی DNA و ترمیم DNA آسیب‌دیده می‌باشد (ص ۲۲۶). رونویسی اطلاعات ژنتیکی در DNA به شکلی که بتواند به پروتئین‌های سلولی ترجمه شود (ص ۲۵۹)، مستلزم سنتز و پردازش اشکال مختلفی از **اسید ریبونوکلئیک (RNA)** است. پردازش RNA برای همایش ریبوزوم‌ها که برای سنتز پروتئین در سیتوزول مورد نیاز است، در داخل هستک رخ می‌دهد.

شبکه آندوپلاسمی در سنتز پروتئین و مسیرهای سنتتیک متعددی نقش دارد

سیتوپلاسم سلول‌های اوکاریوتی یک شبکه وسیع از غشاءهای متصل بیکدیگر دارد که از

1. Nuleolus



شکل ۱۲-۱ شبکه آندوپلاسمی صاف یک سلول پستانداران. SER، شبکه آندوپلاسمی صاف.



شکل ۱۳-۱ شبکه آندوپلاسمی خشن یک سلول پستانداران. پیکان سه‌تایی اشاره به سه ریبوزوم در میان ریبوزوم‌های متعددی دارد که به غشاء متصل هستند. پیکان تکی اشاره به یک میتوکندری برای مقایسه دارد.

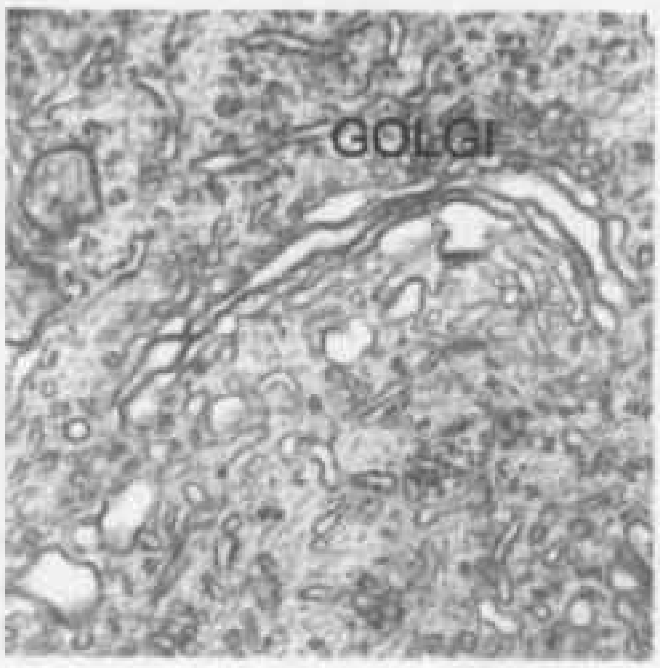
پوشش هسته به غشاء پلاسمایی امتداد یافته و **شبکه آندوپلاسمی**[1] (ER) نامیده می‌شود. این شبکه متشکل از غشاءهایی با ظاهر صاف (ER صاف[2] یا SER) در برخی قسمت‌ها و خشن (ER خشن[3] یا RER) در محل‌های دیگر می‌باشد (اشکال ۱۲-۱ و ۱۳-۱). این اندامک پویا برحسب نیازهای سلولی، از نظر اندازه و شکل تغییر می‌کند. ER مجرای ER را احاطه می‌کند که محل تغییر پروتئین‌های تازه سنتز شده می‌باشد. ظاهر خشن به‌دلیل وجود **ذرات ریبونوکلئوپروتئینی** به‌نام **ریبوزوم** می‌باشد که به سمت سیتوزولی اتصال دارند. در هنگام قطعه‌قطعه‌شدن سلول، شبکه آندوپلاسمی تخریب شده و غشاء آن به یکدیگر پیوسته و تولید وزیکول‌هایی تحت عنوان **میکروزوم** می‌کنند. این وزیکول‌ها در سلول‌ها وجود ندارند.

یکی از وظایف اصلی ریبوزوم‌ها در سطح شبکه آندوپلاسمی، بیوسنتز پروتئین‌ها برای قرارگیری در داخل غشاءها و اندامک‌های سلولی، و انتقال به خارج سلول می‌باشد. ER در تاشدن پروتئین‌ها نقش دارد؛ در صورتی که سیستم تاشدن مضمحل شده و پروتئین‌های تانشده تجمع یابند، مجموعه‌ای از فرایندها برای کاهش استرس ER فعال می‌شوند. شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهند استرس ER در چندین بیماری نقش دارد. شبکه آندوپلاسمی صاف در سنتز لیپید نقش داشته و حاوی آنزیم‌هایی تحت عنوان سیتوکروم P450 (ص ۵۷۸) هستند که هیدروکسیلاسیون انواع مختلفی از ترکیبات داخلی و خارجی را کاتالیز می‌کند. این آنزیم‌ها در بیوسنتز هورمون‌های استروئیدی، برداشت مواد سمی و متابولیسم دارو نقش دارند. شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی همچنین در تولید اندامک‌های سلولی دیگری نظیر لیزوزوم‌ها و پراکسی‌زوم‌ها و در پیام‌رسانی Ca^{2+} نقش دارند (ص ۷۲۲).

دستگاه گلژی در ترشح پروتئین‌ها نقش دارد

دستگاه گلژی (به آن **کمپلکس گلژی** نیز گفته می‌شود) (شکل ۱۴-۱) شبکه‌ای از کیسه‌های غشایی صاف پهن (سیسترنا) و وزیکول‌ها است. این دستگاه همراه با شبکه آندوپلاسمی در سنتز پروتئین‌هایی با مقاصد اختصاصی فعالیت دارند. آنزیم‌های موجود در غشاءهای گلژی انتقال واحدهای کربوهیدراتی به پروتئین‌ها را کاتالیز نموده تا تولید گلیکوپروتئین‌ها شود؛ این فرایند در تعیین مقصد نهایی پروتئین مهم است. گلژی محل اصلی سنتز غشاء جدید و همکاری در تولید لیزوزوم‌ها و پراکسی‌زوم‌ها است. وزیکول‌های غشایی پروتئین‌ها را بین سیسترنا جابه‌جا می‌کنند؛ این وزیکول‌ها از یک سیسترنا جدا شده و به کمک خانواده‌ای از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های **SNARE** با سیسترنای دیگر ادغام می‌شوند. وزیکول‌هایی که از دستگاه گلژی منشاء می‌گیرند، پروتئین‌هایی نظیر هورمون‌ها، پروتئین‌های پلاسمای خون، و آنزیم‌های گوارشی را برای ترشح به غشاء پلاسمایی انتقال می‌دهند. دستگاه گلژی همچنین نقشی در حرکت لیپیدها در سلول دارد.

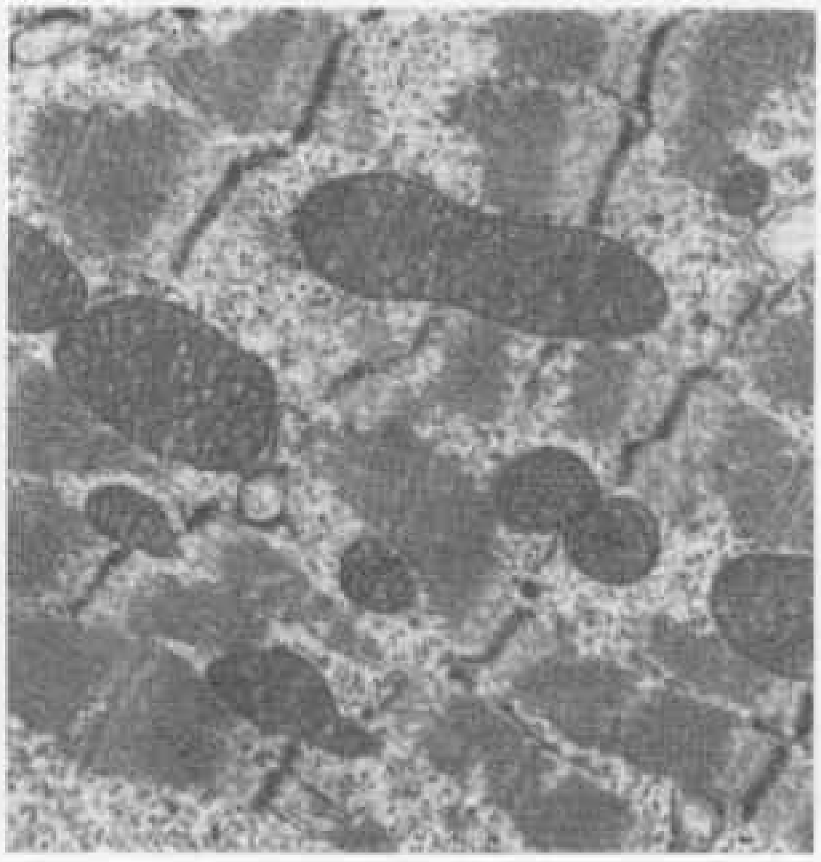
1. Endoplasmic reticulum 2. Smooth ER 3. Rough ER



شکل ۱۴-۱ دستگاه گلژی یک سلول پستاندارن.

میتوکندری‌ها بیشترین نیاز سلولی به ATP را تأمین می‌کنند

میتوکندری‌ها (شکل ۱۵-۱) که به‌خوبی به‌عنوان موتورخانه سلول شناخته شده‌اند، مسئول سنتز بیش از ۹۰٪ آدنوزین تری‌فسفات (ATP) مورد نیاز سلول‌ها است (ص ۷۷۵). میتوکندری‌ها همچنین نقش‌های مهمی در فعالیت‌های سلولی متنوع، نظیر آپوپتوز (ص ۱۳۴۰)، تولید گونه‌های اکسیژن واکنشگر (ص ۷۹۱)، پیام‌رسانی سلولی، و فرایندهای متابولیکی مختلف دارند. در میکروگراف‌های الکترونی، میتوکندری‌ها به‌صورت اجسام میله‌ای، کروی یا رشته‌ای، معمولاً با قطر $0/5-1\mu m$ و طول تا $7\mu m$ مشاهده می‌گردند؛ برخی از این تفاوت‌های موجود در شکل ممکن است به‌دلیل تهیه بافت یا سلول برای ارزیابی میکروسکوپی باشد. ماتریکس داخلی این اندامک، **میتوزول**، توسط دو غشاء احاطه شده است که از نظر ظاهر، ترکیب و عملکرد بیوشیمیایی با یکدیگر اختلاف دارند. غشاء داخلی به داخل ماتریکس امتداد یافته و تولید **کریستا** می‌کند و حاوی ساختمان‌های کروی کوچک متعددی است که از طریق ساقه‌های امتدادیافته به داخل میتوزول، به غشاء اتصال یافته‌اند و مسئول سنتز ATP هستند. ساختمان کریستا برحسب بافت و وضعیت کاری میتوکندری، از حالت توبولی تا لاملار متفاوت می‌باشد. میتوکندری‌ها از طریق شکافت غشاء می‌توانند تقسیم شده و قادرند با یکدیگر ادغام شوند؛ پروتئین‌های مورد نیاز برای این فرایندها مورد شناسایی قرار گرفته‌اند، ولی بسیاری از جزئیات مربوط به مکانیسم‌های واقعی آنها ناشناخته می‌باشد. فعالیت سبب افزایش تعداد میتوکندری‌ها در عضله اسکلتی می‌شود. اجزاء سیستم انتقال الکترون و فسفریلاسیون اکسیداتیو، قسمتی از غشاء داخلی هستند (ص ۷۵۶). مسیرهای متابولیکی برای اکسیداسیون پیرووات حاصل از گلیکولیز، اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه و برخی واکنش‌های مربوط به بیوسنتز اوره و هِم در داخل میتوزول قرار دارند. غشاءهای خارجی و داخلی هر دو حاوی مکانیسم‌هایی برای جابه‌جایی پروتئین‌های اختصاصی هستند. تنوعی در سیستم‌های عرض‌غشایی موجود در غشاء داخلی برای جابه‌جایی



شکل ۱۵-۱ میتوکندری‌های مربوط به یک سلول پستانداران. میکروگراف الکترونی از میتوکندری‌های موجود در فیبرهای عضلانی قلب خرگوش (بزرگنمایی ۳۹۶۰۰ برابر).

ارتباط بالینی ۴-۱

بیماری‌های میتوکندریایی

اولین بیماری که به‌طور اختصاصی منجر به اختلال در تبدیل انرژی میتوکندریایی (بیماری لوفتز[1]) (OMIM۲۳۸۸۰۰) در سال ۱۹۶۲ گزارش شد. یک خانم ۳۰ ساله دچار ضعف عمومی، تنفس بیش از حد، مصرف بالای کالری بدون افزایش وزن، و سرعت متابولیسم پایه بسیار بالا (معیاری از مصرف اکسیژن) بود. این خانم نقصی در مکانیسم کنترل مصرف میتوکندریایی اکسیژن (ص۷۷۶) داشت. از آن به بعد چند صد ناهنجاری ژنتیکی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که همراه با ایجاد تغییراتی در آنزیم‌ها، اسیدهای ریبونوکلئیک، اجزاء انتقال الکترون و سیستم‌های انتقال غشایی میتوکندریایی می‌باشند. برخی از این حالات ناشی از جهش‌هایی در DNA میتوکندریایی و بقیه حاصل جهش‌هایی در DNA هسته‌ای کدکننده پروتئین‌های میتوکندریایی هستند.

اولین بیماری که مشخص شد به‌دلیل جهش در mtDNA به‌وجود آمده است، نوروپاتی بینایی ارثی لبر (OMIM ۵۳۵۰۰۰) می‌باشد که منجر به کوری ناگهانی در ابتدای بزرگسالی می‌شود. بسیاری از بیماری‌های میتوکندریایی سبب اختلال در عضلات اسکلتی و سیستم عصبی مرکزی می‌شوند. آسیب میتوکندری ممکن است به‌دلیل رادیکال‌های آزاد (سوپر اکسیدها) تولیدی در میتوکندری‌ها به‌وجود آید. اختلالات مربوط به میتوکندری‌ها در پاتوفیزیولوژی شیزوفرنی، ناهنجاری دوقطبی، و بیماری‌های دژنراتیو مرتبط با سن نظیر بیماری پارکینسون، بیماری آلزایمر و کاردیومیوپاتی‌ها نقش دارند. اخیراً مطرح شده است که یک جهش واحد در یک t-RNA میتوکندریایی منجر به ایجاد مجموعه‌ای از علائم شامل فشار خون بالا، کلسترول خون بالا، و افزایش مقادیر Mg^{2+} پلاسمایی می‌شود. این بیماری حاصل جهش‌هایی در میزان mtDNA انتقالی از مادر به فرزندان خود است، زیرا میتوکندری‌هایی که در تخم بارورشده به ارث می‌رسند، از تخمک مادر مشتق می‌گردند.

برای جزئیات مربوط به بیماری‌های اختصاصی میتوکندری، ارتباطات بالینی ۶-۶، ۴-۱۴، ۵-۱۴، ۶-۱۴ و ۷-۱۴ را ببینید.

1. Lufts disease

متابولیت‌های مختلف وجود دارد. میتوکندری‌ها یک نقش کلیدی در افزایش سن دارند؛ سیتوکروم c، به عنوان یکی از اجزاء سیستم انتقال الکترون میتوکندریایی، شروع‌کننده آپوپتوز است.

میتوکندری‌ها در همانندسازی خود نقش دارند. آنها چندین نسخه از یک **DNA** حلقوی (**DNA میتوکندریایی یا [mtDNA]**) را همراه با اطلاعات ژنتیکی مربوط به ۱۳ پروتئین میتوکندریایی و برخی ملکول‌های RNA دارند. اندازه این DNA (۱۶,۵۶۹ جفت باز) مشابه اندازه کروموزوم‌های باکتریایی است. وجود یک ژنوم مستقل و شباهت آن با باکتری‌ها این فرضیه را مطرح کرده است که این اندامک‌ها باکتری‌هایی بوده‌اند که توسط یک سلول پیشرفته‌تر برداشت شده و به جای تخریب، یک ارتباط درون همزیستی را به‌وجود آورده است؛ این فرضیه به شکل گسترده‌ای مورد قبول می‌باشد. برآورد شده است که این رویداد ممکن است ۳ میلیارد سال قبل رخ داده باشد. وراثت میتوکندری‌ها از طریق انتقال مادری است و مطالعه حرکت کلی انسان‌ها از طریق ارزیابی تنوع‌های موجود در mtDNA ممکن بوده است. میتوکندری‌ها همچنین ماشین مورد نیاز (ص ۷۸۹) برای کاتالیز سنتز پروتئین را دارد. بیشتر (بیش از ۹۰٪) پروتئین‌های میتوکندریایی از ژن‌های موجود در DNA هسته‌ای منشاء گرفته، در سیتوزول سنتز شده و سپس به داخل این اندامک انتقال داده می‌شوند. چند صد بیماری ژنتیکی مربوط به عملکرد میتوکندری وجود دارد (ارتباط بالینی ۴-۱).

لیزوزوم‌ها برای هضم داخل‌سلولی مورد نیاز هستند

لیزوزوم‌ها (شکل ۱۶-۱) مسئول هضم داخل‌سلولی هر دو مواد خارج سلولی و داخل سلولی هستند. با داشتن تنها یک غشاء محدودکننده، این اندامک‌ها یک pH داخل لیزوزومی اسیدی حدود ۵ را دارند. کلاسی از آنزیم‌های گلیکوپروتئینی، **هیدرولازها**، در داخل این اندامک‌ها قرار دارند که تجزیه هیدرولیتیک پیوندهای کربن-اکسیژن، کربن-نیتروژن، کربن-سولفور و اکسیژن-فسفر را در پروتئین‌ها، لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک کاتالیز می‌کنند. یک فهرست نسبی از آنزیم‌های لیزوزومی در جدول ۷-۱ آورده شده است. محتوای آنزیمی لیزوزوم‌ها در بافت‌های مختلف متفاوت بوده و بستگی به فعالیت‌های بافتی اختصاصی دارد. هیدرولازهای لیزوزومی در pH اسیدی بیشترین فعالیت را دارند و ملکول‌های پیچیده را به ترکیبات دارای وزن ملکولی پایین می‌شکنند که قابلیت استفاده مجدد را دارند. ارتباط بین pH و فعالیت آنزیمی در صفحه ۵۲۴ مورد بحث قرار می‌گیرد. تخریب غشاء لیزوزومی در داخل سلول‌ها منجر به هضم سلولی می‌شود. شرایط پاتولوژیکی مختلفی، نظیر آرتریت، پاسخ‌های آلرژیک، چندین بیماری عضلانی، و تخریب بافتی ناشی از دارو، با آزادسازی آنزیم‌های لیزوزومی ارتباط دارند (ارتباط بالینی ۵-۱). سلول‌ها ذرات خارجی، نظیر میکروارگانیسم‌ها و ویروس‌ها، را به طریق فاگوسیتوز، مایعات را به طریق **پینوسیتوز** و پروتئین‌های اختصاصی را به طریق **آندوسیتوز**، یک فرایند وابسته به گیرنده، برداشت می‌کنند. در هر صورت ماده‌ای که از خارج سلول وارد سلول شده است، در داخل وزیکول‌هایی قرار داده می‌شود که توسط غشاء پلاسمایی احاطه شده‌اند (شکل ۱۷-۱). وزیکول‌های حاوی ماده خارج سلولی با لیزوزوم‌های اولیه ادغام‌شده تا تولید لیزوزوم‌های ثانویه، یا **واکوئل‌های گوارشی**، شود که حاوی موادی برای هضم و هیدرولازهای لیزوزومی برای انجام این هضم می‌باشند. این واکوئل‌ها را می‌توان به طریق میکروسکوپی بر اساس اندازه و اغلب وجود ساختمان‌هایی که به‌طور نسبی هضم شده‌اند، شناسایی نمود.



شکل ۱۶-۱ لیزوزوم‌های یک سلول پستانداران.

ارتباط بالینی ۵-۱

آنزیم‌های لیزوزومی و نقرس

کاتابولیسم پورین‌ها (ص ۱۰۸۹)، ترکیبات هتروسیکلیک نیتروژن‌دار موجود در اسیدهای نوکلئیک، منجر به تشکیل اسید اوریک می‌شود که از طریق ادرار دفع می‌گردد. نقرس ناهنجاری است که در آن تولید اسید اوریک افزایش دارد که نتیجه آن افزایش اسید اوریک در خون و رسوب کریستال‌های اسید اوریک در مفاصل می‌باشد. تظاهرات بالینی شامل التهاب، درد، تورم، و افزایش گرمای برخی مفاصل، به خصوص انگشت بزرگ پا، می‌باشد. اسید اوریک نسبتاً نامحلول است و برخی از علائم بالینی نقرس می‌تواند به‌دلیل آسیب حاصل از کریستال‌های اورات باشد. کریستال‌ها توسط سلول‌های موجود در مفصل فاگوسیته شده و این کریستال‌ها در داخل واکوئل‌های گوارشی داخل سلولی حاوی آنزیم‌های لیزوزومی تجمع می‌یابند. این کریستال‌ها سبب آسیب فیزیکی به واکوئل‌ها و آزادسازی آنزیم‌های لیزوزومی به داخل سیتوزول می‌شوند. با وجود این که pH مطلوب آنزیم‌های لیزوزومی کمتر از pH سیتوزولی است، ولی در pH بالاتر نیز قدری فعالیت هیدرولیتیک دارند که منجر به تخریب اجزاء سلولی و اتولیز سلولی می‌گردند.

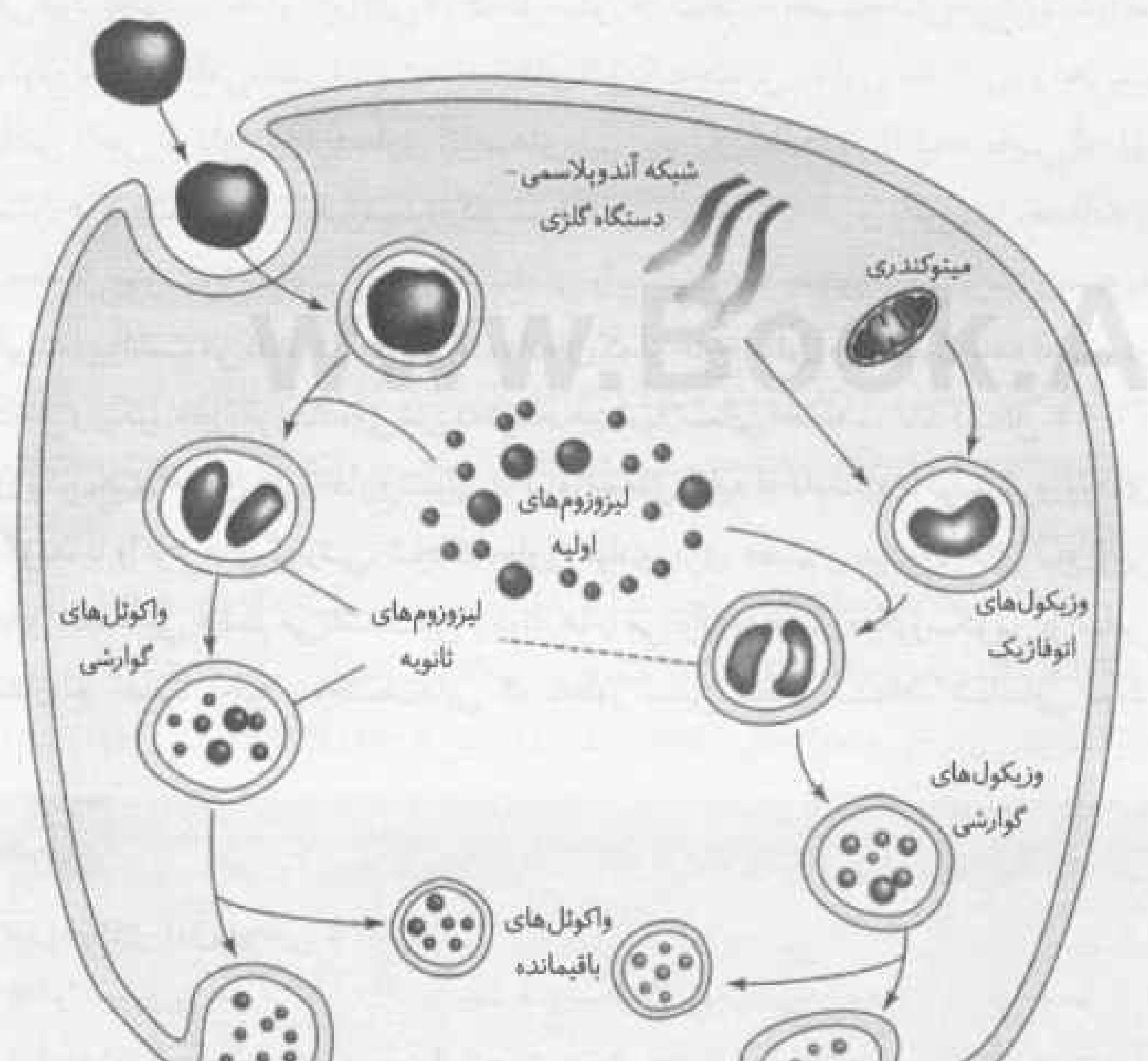
جدول ۷-۱ • نمونه‌هایی از آنزیم‌های لیزوزومی و سوبستراهای آنها

نوع سوبسترا و آنزیم	سوبسترای اختصاصی
آنزیم‌های هیدرولیزکننده پلی‌ساکاریدها	
α- گلوکوزیداز	گلیکوژن
α- فوکوزیداز	فوکوز غشایی
β- گالاکتوزیداز	گالاکتوزیدها
α- مانوزیداز	مانوزیدها
β- گلوکورونیداز	گلوکورونیدها
هیالورونیداز	اسید هیالورونیک و کندروایتین سولفات‌ها
آریل سولفاتاز	سولفات‌های آلی
لیزوزیم	دیوارهای سلول باکتری
آنزیم‌های هیدرولیزکننده پروتئین‌ها	
کاتپسین‌ها	پروتئین‌ها
کلاژناز	کلاژن
الاستاز	الاستین
پپتیدازها	پپتیدها
آنزیم‌های هیدرولیزکننده اسیدهای نوکلئیک	
ریبونوکلئاز	RNA
داکسی ریبونوکلئاز	DNA
آنزیم‌های هیدرولیزکننده لیپیدها	
لیپازها	تری‌آسیل‌گلیسرول و استرهای کلسترول
استراز	استرهای اسید چرب
فسفولیپاز	فسفولیپیدها
فسفاتازها	
فسفاتاز	فسفومنواسترها
فسفودی استراز	فسفودی‌استرها
سولفاتازها	
کندروایتین سولفاتاز	هیاران سولفات
آریل سولفاتاز B	درماتان سولفات

لیزوزوم‌های اولیه آنهایی هستند که با وزیکول‌های حاوی مواد هضم شدنی ادغام نشده‌اند.

پروتئین‌های سلولی، اسیدهای نوکلئیک، لیپید و اندامک‌هایی نظیر میتوکندری‌ها، در یک حالت پویای سنتز و تخریب وجود دارند. لیزوزوم‌ها مسئول هیدرولیز این اجزاء داخل سلولی از طریق یک فرایند شدیداً تحت تنظیم به‌نام اتوفاژی هستند. موادی که قرار است تخریب شوند، شناسایی شده و توسط لیزوزوم‌ها برداشت می‌شوند و یا ابتدا در داخل وزیکول‌های غشایی قرار می‌گیرند که با لیزوزوم‌های اولیه ادغام می‌گردند (شکل ۱۷-۱). اتوفاژی نه تنها در سلول‌های پستانداران تحت استرس و بلکه همچنین در سلول‌های طبیعی مهم است؛ گرسنگی و هورمون‌های اختصاصی، اتوفاژی را القاء می‌کنند.

محصولات هضم لیزوزومی از لیزوزوم‌ها آزاد شده و دوباره توسط سلول مورد استفاده قرار می‌گیرند. مواد غیرقابل هضم در داخل وزیکول‌هایی تحت عنوان اجسام باقیمانده



شکل ۱۷-۱ نمایش دیاگرامی از نقش لیزوزوم‌ها در هضم داخل سلولی موادی که به‌طریق فاگوسیتوز (هتروفاژی) وارد سلول شده‌اند و اجزاء سلولی (اتوفاژی). در هر دو فرایند موادی که قرار است هضم شوند، توسط یک وزیکول غشایی احاطه شده‌اند و به‌دنبال ادغام با یک لیزوزوم اولیه تولید لیزوزوم ثانویه می‌کنند که در داخل آن هضم رخ می‌دهد.

ارتباط بالینی ۶-۱

کمبود اسید لیپاز لیزوزومی

اسید لیپاز لیزوزومی انسان[1] (hLAL) تری‌آسیل گلیسرول‌ها را به اسیدهای چرب آزاد و گلیسرول و استرهای کلستریل را به کلسترول و اسیدهای چرب آزاد هیدرولیز می‌کنند. این آنزیم نقش مهمی در متابولیسم کلسترول دارد که کلسترول را برای رفع نیازهای سلول دردسترس قرار می‌دهد. بیماری ذخیره‌ای استر کلستریل[2] (CESD) و بیماری وُلمن[3] (OMIM ۲۷۸۰۰۰) دو شکل فنوتیپی متفاوت کمبود ژنتیکی hLAL هستند؛ هر دوی این بیماری‌ها بسیار نادر می‌باشند. CESD معمولاً در دوران بزرگسالی تشخیص داده می‌شود که با هیپرکلسترولمی، بزرگی کبد، و شروع زودرس آترواسکلروز شدید مشخص می‌گردد. افراد مبتلا فعالیت hLAL را دارند ولی میزان آن بسیار پایین (کمتر از ٪۵ طبیعی) است. این میزان واضحاً برای هیدرولیز تری آسیل گلیسرول کافی است، ولی برای هیدرولیز استرهای کلستریل کافی نمی‌باشد. بیماران از نظر وجود یک جهش در محل اتصال اسپلایس بر روی هر دو آلل هُموزیگوس هستند که نتیجه آن تولید آنزیم فاقد فعالیت کاتالیتیکی و ناپایدار است.

بیماری وُلمن در اطفال نمایان شده و معمولاً تا یک سالگی کشنده است. هیچ فعالیت hALA قابل جستجویی وجود ندارد. هم تری آسیل گلیسرول و هم استرهای کلستریل در بافت‌ها تجمع می‌یابند. بیماران از نظر جهشی که منجر به عدم وجود فعالیت آنزیمی می‌شود، هُموزیگوس هستند.

1. Human lysosomal acid lipase
2. Cholesteryl ester sorage disease
3. Wolman disease

تجمع می‌یابند که محتویات آنها به‌طور طبیعی با اگزوسیتوز از سلول برداشت می‌شوند. برخی اجسام باقیمانده حاوی غلظت‌های بالای یک ماده رنگدانه‌دار هستند که از نظر شیمیایی ناهمگن بوده و حاوی اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه و پروتئین‌ها می‌باشند. این مواد در سلول‌ها تجمع می‌یابند و **لیپوفوشین**[1] یا «رنگدانه سن[2]» یا «رنگدانه سائیدگی[3]» نامیده می‌شود. لیپوفوشین به‌خصوص در نورون‌های پس‌میتوزی[4] و سلول‌های عضلانی مشاهده شده است و در فرایند افزایش سن نقش دارد.

برخی آنزیم‌های لیزوزومی به‌طور طبیعی برای هضم مواد خارج سلولی در بافت همبند و غده پروستات، از سلول ترشح می‌شوند. در بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی ژنتیکی (ص ۳۲۳)، آنزیم‌های لیزوزومی وجود ندارند و در نتیجه ماده مربوط به آنزیم از دست‌رفته در داخل لیزوزوم‌ها تجمع می‌یابد. لیزوزوم‌ها با هضم مواد بزرگ می‌شوند که سبب تداخل با فرایندهای سلولی طبیعی می‌گردد (ارتباط بالینی ۶-۱). یکی از اینها بیماری سلول I می‌باشد که در آن مکانیسم سلولی برای هدایت آنزیم‌های لیزوزومی به داخل لیزوزوم‌ها طی سنتز آنها دچار نقص می‌باشد. در عوض، آنزیم‌های هیدرولیتیک به خارج سلول انتقال داده شده و به ماتریکس خارج سلولی آسیب می‌رساند (ارتباط بالینی ۸-۶ را ببینید).

پراکسی‌زوم‌ها نقش مهمی در متابولیسم لیپیدها دارند

اکثر سلول‌های پستانداران، تک‌یاخته‌ها و گیاهان، اندامک‌هایی تحت عنوان **میکروبادی** یا **پراکسی‌زوم** دارند که نام اخیر آنها به‌دلیل توانایی آنها در تولید یا مصرف **پراکسید هیدروژن**

1. Lipofuscin 2. Age pigment 3. Wear and tear pigment 4. Postmitotic

(۱) $2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$

(۲) $RH_2 + H_2O_2 \longrightarrow R + 2H_2O$

شکل ۱۸-۱ واکنش‌هایی که توسط کاتالاز کاتالیز می‌شوند.

(H_2O_2) می‌باشد. این اندامک‌ها یک غشاء دارند و به صورت ساختمان‌های کروی یا بیضی کوچک (با قطر $0{,}3-1{,}5\,\mu m$) همراه با یک شبکه ظریف توبول‌ها در ماتریکس خود می‌باشند. غلظت پروتئینی بالای موجود در ماتریکس برخی پراکسی‌زوم‌ها منجر به ایجاد انکلوزیون‌های کریستالی می‌شود. در میان سلول‌های مختلف، پراکسی‌زوم‌ها از نظر ترکیب آنزیمی، عملکرد و تعداد متفاوت هستند. در پراکسی‌زوم‌های مربوط به بافت‌های مختلف، بیش از ۵۰ آنزیم مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که واکنش‌های اکسیداتیو و بیوسنتتیک را کاتالیز می‌کنند.

پراکسی‌زوم‌ها برای اکسیداسیون اسیدهای چرب دارای زنجیر بسیار بلند (ص ۹۴۵) و سنتز گلیسرولیپیدها، گلیسرول اتر لیپیدها (پلاسمالوژن‌ها)، و ایزوپرنوئیدها (ص ۹۷۰) لازم هستند. در موش‌های خانگی نشان داده شده است که پراکسی‌زوم‌ها یک نقش فیزیولوژیک مهم در سنتز و تجزیه لیپید دارند. پراکسی‌زوم‌ها همچنین حاوی آنزیم‌هایی برای اکسیداسیون D-آمینو اسیدها، اسید اوریک و اسیدهای ۲-هیدروکسی مختلف با استفاده از O_2 و تولید H_2O_2 می‌باشند. **کاتالاز** به عنوان یک آنزیم حاوی هِم (ص ۹۴۵)، در پراکسی‌زوم‌ها وجود دارد و کاتالیز کننده تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن و همچنین اکسیداسیون ترکیبات مختلف توسط H_2O_2 می‌باشد (شکل ۱۸-۱). سلول‌ها با قراردادن آنزیم‌های تولیدکننده پراکسید و مصرف‌کننده پراکسید در یک بخش، خود را در برابر سمّیت H_2O_2 محافظت می‌کنند.

پروتئین‌های مسئول بیوژنز پراکسی‌زوم‌ها مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. چندین کلاس از **گزنوبیوتیک‌ها**، یعنی مواد خارجی، شامل آسپیرین، منجر به ازدیاد پراکسی‌زوم‌ها در کبد می‌شوند. بیش از ۲۵ بیماری ژنتیکی مرتبط با پراکسی‌زوم‌ها وجود دارد؛ اینها با یکدیگر به عنوان ناهنجاری‌های بیوژنز پراکسی‌زومی گروه‌بندی می‌شوند (ارتباط بالینی ۷-۱).

اسکلت سلولی محتویات داخل‌سلولی را سازماندهی می‌کنند

در داخل سیتوپلاسم سلول‌های اوکاریوتی مجموعه‌ای از میکروتوبول‌ها، فیلمان‌های حدواسط و فیلمان‌های اکتینی (میکروفیلمان‌ها) به عنوان شبکه اسکلت سلولی یا داربست وجود دارند (ص ۱۳۰۴). این ساختمان پویا در حفظ مورفولوژی سلول، انتقال وزیکول‌ها و اندامک‌ها، حرکت سلولی و تقسیم سلولی نقش دارند. اسکلت سلولی شامل **میکروتوبول‌های** متشکل از مولتیمرهایی **توبولین** است؛ برحسب نیاز سلول، این پروتئین سریعاً به شکل ساختمان‌های توبولی همایش می‌یابد و دوباره تفکیک می‌گردد. اکتین و میوزین فیلمان‌های سلولی بسیار مهمی را در عضله مخطط به‌وجود می‌آورند که در این محل مسئول انقباض عضلانی هستند (ص ۱۲۸۷). سه فوق خانواده از پروتئین‌های مکانیکی-شیمیایی، شامل میوزین، دینئین، و کینزین، برای حرکت اجزاء سلولی، انرژی شیمیایی را به انرژی مکانیکی تبدیل می‌کنند (ص ۱۳۰۳). این موتورهای ملکولی با اسکلت سلولی ارتباط دارند. دینئین در حرکت مژک‌ها

و تاژک‌ها همکاری دارند، در حالی‌که کینزین نیروی پیشبرنده برای حرکت وزیکول‌ها و اندامک‌ها در طول میکروتوبول‌ها، به‌خصوص در آکسون‌های نرونی هستند. این پروتئین‌های موتوری نقش قابل‌توجهی در پاتوژنز انواع مختلفی از بیماری‌ها دارند.

سیتوزول حاوی اجزاء سلولی محلول است

ساده‌ترین، ولی نه از نظر شیمیایی، ساختمان سلولی مربوط به شیره فاقد اندامک، یا **سیتوزول** می‌باشد. اینجا است که بسیاری از واکنش‌ها و مسیرهای متابولیکی (نظیر گلیکولیز، گلیکوژنز، گلیکوژنولیز و سنتز اسیدهای چرب) انجام می‌شود. سنتز پروتئین‌ها بر روی ریبوزوم‌های آزاد که اغلب به شکل پلی‌زوم وجود دارند و آنهایی که به شبکه آندوپلاسمی متصل هستند، در داخل سیتوزول انجام می‌شود که حاوی تمامی ترکیبات واسط مورد نیاز است. با وجود این که ساختمان واضحی برای سیتوزول وجود ندارد، به‌دلیل محتوای پروتئینی بالا، یک مخلوط واقعاً همگن از مواد محلول وجود ندارد و معتقدند بخش‌های وظیفه‌داری در سرتاسر سیتوزول وجود دارند. بسیاری از واکنش‌ها در نواحی انتخابی متمرکز هستند که در آن محل‌ها دسترسی به سوبسترا بسیار مساعدتر می‌باشد. وضعیت فیزیک و شیمیایی واقعی سیتوزول به‌خوبی مشخص نیست. مشکل دیگر در ارزیابی ترکیب سیتوپلاسم این است که در سیتوزول جدا شده برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها به‌صورت پروتئین‌های محلول وجود دارند، ولی در سلول سالم اینها ممکن است اتصال سُست به ساختمان‌های غشایی یا اجزاء اسکلت سلولی داشته باشند.

۶-۱ • یکپارچگی و کنترل فعالیت‌های سلولی

یک سلول اوکاریوتی، ساختمان پیچیده‌ای است که یک محیط درون سلولی را حفظ می‌کند که شرایط را برای انجام همزمان بسیاری از واکنش‌ها و فرایندهای پیچیده شیمیایی فراهم می‌سازد. برای این منظور نیاز به‌شدت بالای کنترل و یکپارچگی می‌باشد. به‌علاوه، سلول‌های مربوط به موجودات پرسلولی از طریق اعمال اثراتی بر روی یکدیگر در جهت حفظ تعادل بین فعالیت‌های بافتی و سلولی، در حفظ سلامت کل موجود زنده همکاری می‌کنند. فعالیت‌های بسیار کمی به شکل کاملاً مستقل عمل می‌کنند؛ تغییر در عملکرد می‌تواند اثراتی، مثبت یا منفی، را بر روی سایر فعالیت‌ها داشته باشد. همان‌طور که در سر تا سر این کتاب شرح داده خواهد شد، کنترل فعالیت در چندین سطح، از بیان یک ژن، تا تغییر غلظت یک آنزیم یا افکتور پروتئینی، تا تغییر غلظت سوبسترا یا میزان کوآنزیم‌ها در جهت تنظیم یک واکنش آنزیمی اختصاصی، به اجرا گذاشته می‌شود. یکپارچگی بسیاری از فرایندهای سلولی توسط پروتئین‌هایی کنترل می‌شود که به‌عنوان فعال‌کننده‌ها یا مهارکننده‌هایی عمل می‌کنند که هومئوستاز سلولی را حفظ می‌کنند. بسیاری از فرایندهای سلولی طوری برنامه‌ریزی می‌شوند که تحت شرایط اختصاصی انجام شوند؛ برای مثال،

ارتباط بالینی ۷-۱

ناهنجاری‌های بیوژنز پراکسی‌زومی (PBD)

پراکسی‌زوم‌ها مسئول تعدادی از واکنش‌های متابولیکی مهم، شامل سنتز اترهای گلیسرولی، کاهش طول اسیدهای چرب زنجیر - بسیار بلند برای اکسید-اسیون کامل در میتوکندری‌ها، و اکسیداسیون زنجیر جانبی کلسترول برای سنتز اسیدهای صفراوی هستند. ناهنجاری‌های بیوژنز پراکسی‌زومی[1] (PBD) (OMIM ۶۰۱۵۳۹) شامل بیش از ۲۵ ناهنجاری ژنتیکی و فنوتیپی مرتبط می‌باشند که فعالیت‌های آنزیمی پراکسی‌زومی را درگیر می‌کنند. اینها بیماری‌های اتوزومال مغلوب نادری هستند که با کاهش مقادیر لیپیدهای اتری-گلیسرولی (پلاسمالوژنی) و افزایش میزان اسیدهای چرب با زنجیر بسیار بلند (۲۴ و ۲۶ کربنه) و مشتقات اسید کُلستانوئیک (پیش‌ساز اسیدهای صفراوی) مشخص می‌شوند. این بیماری می‌تواند سبب اختلالاتی در کبد، کلیه، مغز و سیستم اسکلتی شود. سندروم زِل‌وِگر[2] شدیدترین حالت است که به‌دلیل عدم وجود پراکسی‌زوم‌های وظیفه‌دار مشخص می‌شود؛ بیمار معمولاً تا ۶ ماهگی می‌میرد. در این حالت، نقص ژنتیکی در مکانیسم انتقال آنزیم‌ها به داخل ماتریکس پراکسی‌زوم‌ها است. برخی حالات PBD نتیجه جهش‌های اسپلایس دهنده یا بدمعنی (ص ۲۷۳) هستند؛ در برخی موارد، یک آنزیم متابولیکی وجود ندارد یا نقص در یک جزء انتقال غشایی است. در برخی موارد می‌توان بیماری را قبل از تولد با آزمایش آنزیم‌های پراکسی‌زومی یا اسیدهای چرب در سلول‌های مایع آمنیوتیک، تشخیص داد.

1. Peroxisome biogenesis disorders
2. Zellweger syndrome

تقسیم سلولی در سلول‌های طبیعی تنها زمانی انجام می‌شود که فرایندهای مورد نیاز تقسیم فعال گردند (ص ۱۳۳۲). لذا مجموعه‌های منظم و یکپارچه‌ای از واکنش‌ها وجود دارند که به تقسیم یک سلول به دو سلول دختر منتهی می‌شوند. مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (ص ۱۳۴۲) یک فرایند شدیداً تحت تنظیم می‌باشد که در تمامی سلول‌های پستانداران رخ می‌دهد، ولی مراحل متفاوت این فرایند از بافتی به بافت دیگر متفاوت است. بسیاری از بیماری‌ها حاصل نارسایی در مکانیسم‌های کنترلی اختصاصی هستند. با ادامه شناخت پیچیدگی سلول‌های بیولوژیکی، از این که تعداد بیشتری خطا یا افراد مبتلا به حالات غیرطبیعی وجود ندارد، متحیر خواهیم شد.

بدین‌ترتیب زمانی که در فصول بعد به مطالعه اجزاء شیمیایی و فعالیت‌های سلولی متفاوت می‌پردازیم، مهم است به اثرات همزمان فشارها، فعالیت‌های مجاور و محیطی توجه داشته باشیم. تنها با قرار دادن تمامی قسمت‌ها و فعالیت‌های مجزا یک سلول، همانند یک پازل، به عجایب سلول‌های زنده پی‌خواهیم برد.

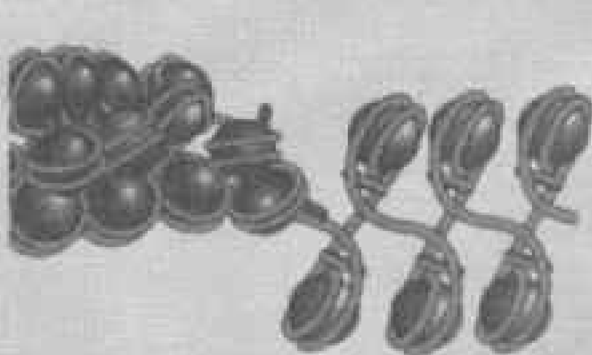
واژه‌های کلیدی

DNA
اوکاربوت‌ها
نوکلوئید
پروکاربوت‌ها
اندامک‌ها
آب
پیوندهای هیدروژنی
آلیفاتیک
آنیون
کاتیون
غیرالکترولیت‌ها
املاح
الکترولیت‌های قوی
K'_{eq}
آنیون هیدرونیوم
الکترولیت‌های ضعیف
اسید بروشتد
باز مزدوج
حاصلضرب یونی آب
pH
گیرنده پروتون
دهنده پروتون
اسید ضعیف
pK′
جفت مزدوج
اسید کربونیک
بافری‌نمودن
ظرفیت بافری
معادله هندرسن-هاسلباخ
ترکیب یونی
غشاء پلاسمایی
اسکلت سلولی
پوشش هسته‌ای
هسته
هستک
شبکه آندوپلاسمی
دستگاه گلژی
ریبوزوم‌ها
میتوکندری‌ها
میتوزول
لیزوزوم‌ها
واکوئل‌های گوارشی
آندوسیتوز
هیدرولاز
میکروبادی‌ها
پراکسی‌زوم‌ها
کاتالاز
میکروتوبول‌ها
سیتوزول
گزنوبیوتیک



۲

DNA و RNA: ترکیب و ساختمان



مفاهیم کلیدی

- براساس عقیده بنیادی بیولوژی ملکولی، اطلاعات بیولوژیکی که توسط توالی‌های اسید نوکلئیکی موجود در DNA و RNA مشخص می‌گردند، تعیین‌کننده توالی‌های پروتئینی و بنابراین خصوصیات پروتئینی هستند.
- ساختمان اسیدهای نوکلئیک توسط خصوصیات شیمیایی اجزاء تشکیل‌دهنده آن، شامل فسفات، قند و نوکلئوباز، تعیین می‌شود.
- ملکول‌های DNA سلولی معمولاً پلیمرهای دو رشته ′۲-داکسی ریبونوکلئوزید ′۵منوفسفات‌ها هستند.
- مکمل بودن بازهای موجود در مارپیچ دورشته به DNA این امکان را می‌دهد تا به‌عنوان ماده ژنتیکی سلول عمل کند.
- طول یک ملکول DNA بسیار بیشتر از ابعاد یک سلول است؛ لذا DNA ساختمان‌های شدیداً منظمی را اتخاذ می‌کند که این ملکول را به میزان زیادی به صورت کروماتین متراکم می‌نماید.
- توالی نوکلئوتیدی DNA فعالیت آن را تعیین می‌کند.
- ملکول‌های RNA سلولی پلیمرهای تک رشته ریبونوکلئوزید ′۵ منو-فسفات‌ها هستند.
- ساختمان سوم RNA توسط پیوندهای هیدروژنی درون‌ملکولی تعیین می‌شود.
- ملکول‌های RNA سلولی در انتقال اطلاعات، کاتالیز و تنظیم نقش دارند.

۱-۲ • اسیدهای نوکلئیک و اطلاعات بیولوژیکی

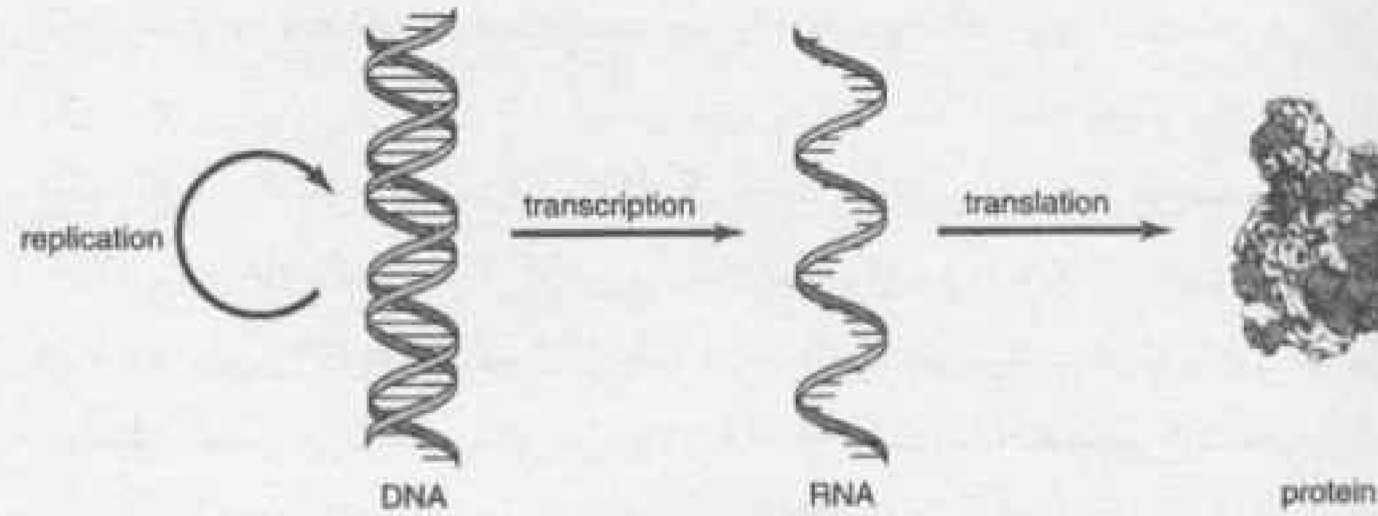
عقیده بنیادی بیولوژی ملکولی

یکی از خصوصیات برجسته موجودات زنده، توانایی آنها در تولید مثل می‌باشد. اطلاعاتی که هر کدام از اشکال بی‌همتای حیات را به وجود می‌آورند، باید حفظ شده و به نسل‌های بعدی انتقال داده شوند. به استثناء برخی ویروس‌ها، بیوملکول مورد استفاده برای ذخیره اطلاعات، **اسید داکسی‌ریبونوکلئیک (DNA)** است. این ملکول به دلیل پایداری شیمیایی و توانایی در کد نمودن میزان فوق‌العاده زیاد اطلاعات با استفاده از یک رمز چهار-حرفی ساده، برای این وظیفه بسیار مناسب است. با این وجود، DNA تنها قسمتی از هسته معماری حیات است. **اسید ریبونوکلئیک (RNA)** و پروتئین نقش‌های برابر مهمی را بازی می‌کنند. ارتباط بین این سه کلاس ملکول‌ها، «عقیده بنیادی[1] بیولوژی ملکولی» (شکل ۱-۲) را شامل می‌شود که می‌گوید DNA ذخیره اطلاعات است که توالی RNA را تعیین می‌کند که به نوبه خود تعیین‌کننده ساختمان پروتئین است. بیشتر ساختمان و بیوشیمی سلول‌ها حاصل خصوصیات مربوط به اجزاء پروتئینی آنها می‌باشد. این خصوصیات توسط قسمت‌هایی از توالی DNA تعیین می‌گردد. با این وجود، اطلاعات نمی‌تواند مستقیماً از DNA به پروتئین جریان یابد و برای این منظور نیاز به RNA برای انتقال اطلاعات می‌باشد. اطلاعات ژنتیکی از طریق رونویسی[2] از DNA به RNA انتقال داده می‌شود. سپس در سطح ریبوزوم، توالی موجود در RNA به یک توالی پروتئینی ترجمه[3] می‌گردد. DNA همچنین به‌واسطه عمل به‌عنوان الگویی برای همانندسازی[4] خود، نقش اساسی را در وراثت بازی می‌کند. به‌دنبال چندین کشف، این نقش‌های متفاوت هر کدام از این بیوملکول‌ها در عقیده بنیادی لکه‌دار شده است. برای مثال، RNA می‌تواند به‌عنوان یک کاتالیست (ریبوزیم) در واکنش‌های بیوشیمیایی شرکت کند و جزء فعال ریبوزوم‌ها را تشکیل می‌دهد که ماشین سنتز پروتئین در سلول هستند. RNA می‌تواند به عنوان الگویی برای سنتز DNA عمل نموده تا جریان طبیعی اطلاعات را معکوس کند (رونویسی معکوس[5]). برخی بیماری‌ها می‌توانند از طریق پروتئین‌ها و بدون نیاز به اسیدهای نوکلئیک انتقال داده شوند. با این وجود، اسیدهای نوکلئیک نقش اصلی را در ذخیره‌سازی و انتقال اطلاعات بیولوژیک برعهده دارند.

DNA می‌تواند سلول‌ها را ترانسفورمه کند

تا قبل از دهه ۱۹۵۰، اسیدهای نوکلئیک عموماً به عنوان موادی با اهمیت سلولی محدود در نظر گرفته می‌شدند. اولین مدرک نقش DNA به‌عنوان ماده ژنتیکی طی دهه ۱۹۲۰ به‌دست آمد، ولی تا سال ۱۹۴۴ این نقش DNA به‌طور قطعی نشان داده نشد. آزمایشات کلیدی با استفاده از دو سوش پنوموکوک، باکتری عامل پنومونی، انجام شدند. در زمان کشت،

1. Central dogma 2. Transcription 3. Translation 4. Replication 5. Reverse transcription



شکل ۱-۲ عقیده بنیادی بیولوژی ملکولی.

یکی از این سوش‌ها تولید کلونی‌های صاف[1] و دیگری تولید کلونی‌های خشن[2] می‌کند؛ اینها را به ترتیب اشکال S و R نامیدند. شکل S بیماریزا و شکل R غیربیماریزا است؛ این دو شکل از نظر ژنتیکی متفاوت هستند و می‌توانند به طور خود به خوی به یکدیگر تبدیل شوند. مجاورت باکتری‌های شکل R با DNA خالص جدا شده از شکل S منجر به **ترانسفورماسیون**[3] آنها به شکل S شد. این ترانسفورماسیون به‌طور دائم به نسل‌های بعدی انتقال یافت. این تغییر نشان داد که DNA عامل ترانسفورمه‌کننده است و ماده مسئول انتقال اطلاعات ژنتیکی از یک نسل به نسل دیگر می‌باشد. ارتباط بالینی ۱-۲ واکسن‌هایی متکی بر ترانسفورماسیون سلول‌های پستانداران با DNA را شرح می‌دهد.

ظرفیت اطلاعات DNA فوق‌العاده است

یکی از خصوصیات برجسته DNA توانایی آن در کد نمودن کمّیت عظیمی از اطلاعات ژنتیکی است. برای مثال، یک سلول انسانی حاوی اطلاعاتی برای سنتز حدود ۲۰,۰۰۰ تا ۲۵,۰۰۰ پروتئین است. این اطلاعات در داخل هسته سلول ذخیره می‌شود که حدود ۰,۰۰۰۰۱ m قطر دارد. برخلاف این تراکم، اطلاعات موجود در DNA به‌راحتی در دسترس قرار می‌گیرد و به محض درخواست، دو برابر می‌شود. توانایی در ذخیره میزان زیادی اطلاعات در داخل ملکول‌ها و دسترسی راحت به آنها، هنوز در ماورای فناوری اطلاعات امروزی قرار دارد. ظرفیت اسیدهای نوکلئیک در حفظ و انتقال اطلاعات بایگانی‌شده به شکل کارآمدی مستقیماً ناشی از ساختمان شیمیایی آنها می‌باشد.



شکل ۲-۲ بازهای پورینی و پیریمیدینی اصلی موجود در DNA و RNA.

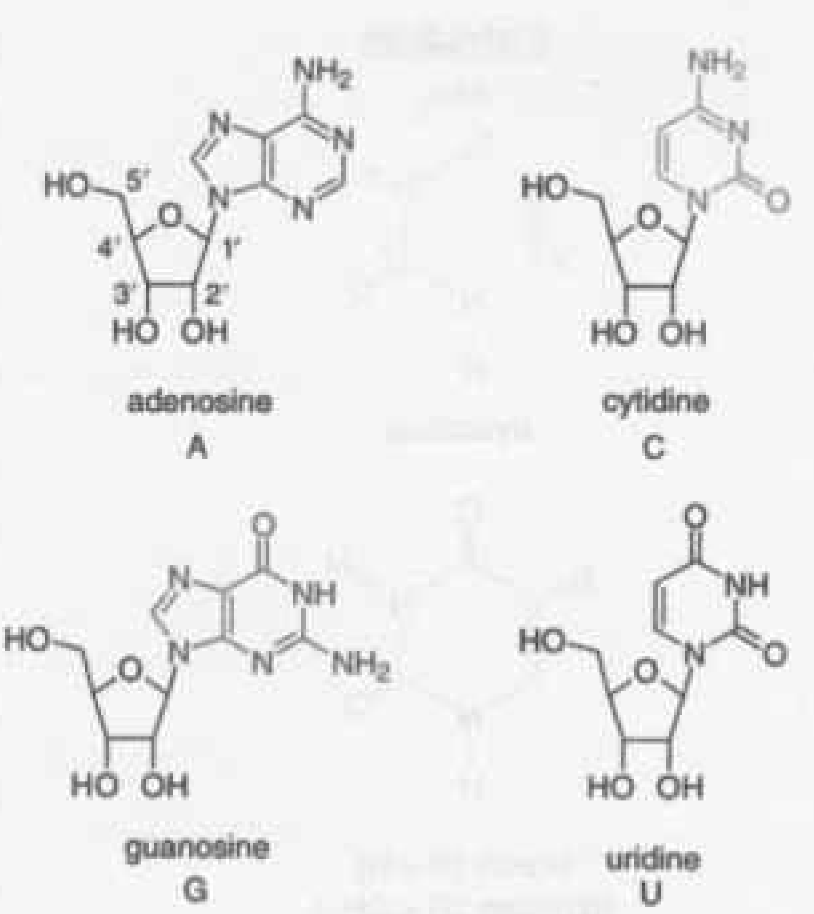
۲-۲ • اجزاء ساختمانی اسیدهای نوکلئیک: نوکلئوبازها، نوکلئوزیدها، و نوکلئوتیدها

اسیدهای نوکلئیک پلیمرهای خطی از واحدهای **نوکلئوتیدی** هستند. هر ملکول متشکل از یک استر فسفات، یک قند پنتوز، و یک نوکلئوباز هتروسیکلیک است. قند در RNA،

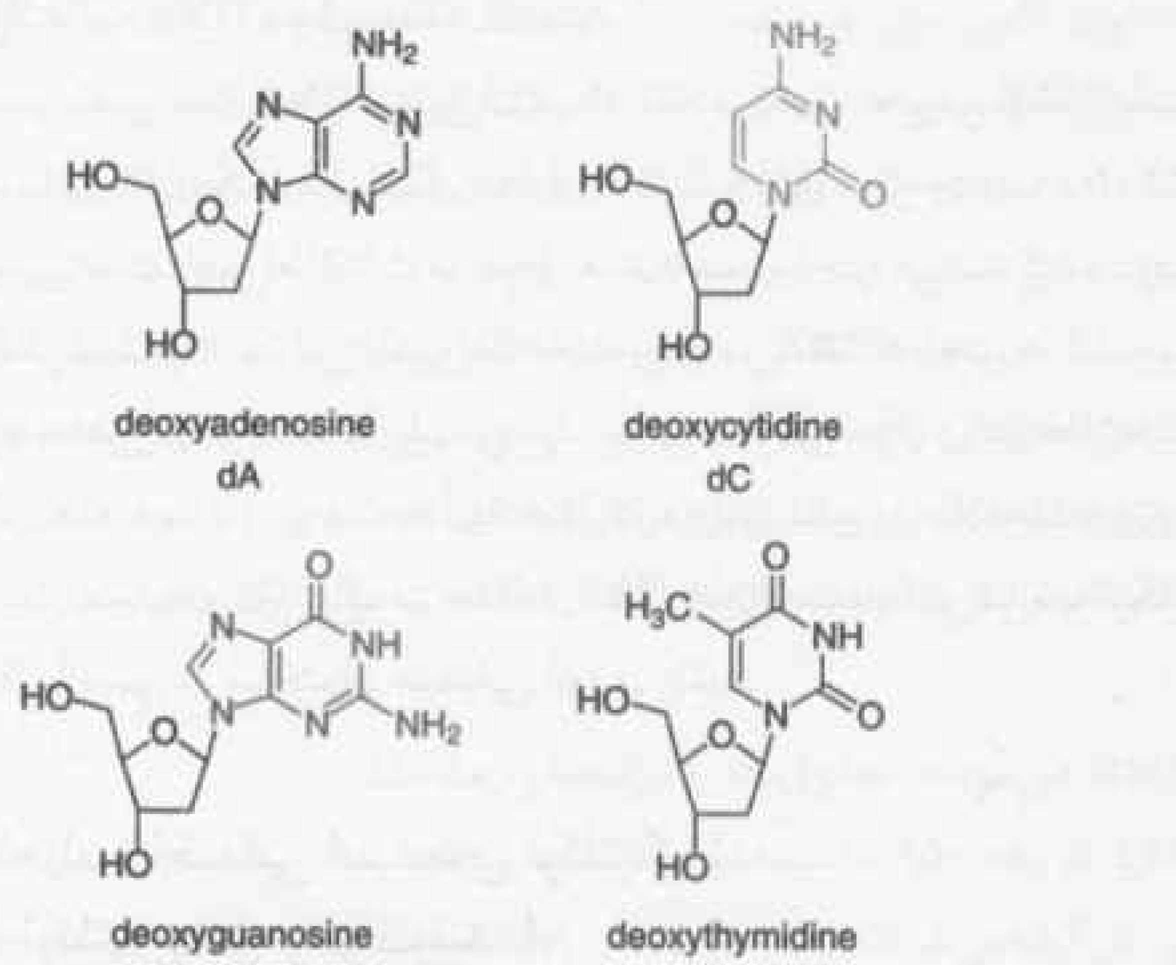
1. Smooth 2. Rough 3. Transformation

D-ریبوز و در DNA، یک قند مرتبط، یعنی ۲- داکسی-D-ریبوز است. در هر صورت، باز از طریق یک پیوند β-N-گلیکوزیدی به موقعیت ۱ قند اتصال دارد. دو کلاس نوکلئوبازهای اصلی در اسیدهای نوکلئیک وجود دارند: **پورین‌ها و پیریمیدین‌ها** (شکل ۲-۲). پورین‌های اصلی شامل **گوانین** و **آدنین** هستند که هم در DNA و هم در RNA وجود دارند و از طریق N9 به قند اتصال می‌یابند. سه نوکلئوباز پیریمیدینی اصلی شامل **سیتوزین، اوراسیل** و **تیمین** می‌باشند. سیتوزین هم در DNA و هم در RNA وجود دارند. ولی اوراسیل عموماً تنها در RNA و تیمین عموماً تنها در DNA یافت می‌شود. اتصال هر کدام از این پیریمیدین‌ها به قند از طریق موقعیت N1 صورت می‌گیرد. نوکلئوبازی که با یکی از این قندهای پنتوز گلیکوزیله شده است، یک نوکلئوزید می‌باشد. نوکلئوزیدهایی که حاوی ریبوز هستند را **ریبونوکلئوزید** (شکل ۳-۲) و انواع حاوی داکسی‌ریبوز را **داکسی ریبونوکلئوتید** می‌گویند (شکل ۴-۲). چهار نوکلئوزید معمولاً در RNA یافت می‌شوند که شامل **آدنوزین (A)**، **گوانوزین (G)**، **سیتیدین (C)**، و **اوریدین (U)** می‌باشند و به‌همین ترتیب چهار نوکلئوزید در DNA وجود دارند که شامل **داکسی‌آدنوزین (dA)**، **داکسی‌گوانوزین (dG)**، **داکسی‌سیتیدین (dC)**، و **داکسی‌تیمیدین (dT)** هستند. به‌علاوه، بیش از ۸۰ نوکلئوتید جزئی یافت شده است که به‌طور طبیعی در اسیدهای نوکلئیک وجود دارند.

نوکلئوتیدها استرهای فسفات نوکلئوزیدها هستند (شکل ۵-۲). هر کدام از گروه‌های



شکل ۳-۲ ساختمان ریبونوکلئوزیدها. مخفف‌های تک‌حرفی هر ترکیب نشان داده شده است. این مخفف‌ها همچنین برای بازها و نوکلئوتیدهای مربوطه، و در برخی موارد برای داکسی‌ریبونوکلئوزیدها، به‌کار می‌روند.



شکل ۴-۲ ساختمان داکسی‌ریبونوکلئوزیدها. وجود ۲-داکسی ریبوز با یک (d) قبل از مخفف تک‌حرفی نشان داده می‌شود. توجه داشته باشید که تیمیدین (T) اغلب به‌جای داکسی تیمیدین (dT) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ارتباط بالینی ۲-۱

واکسن‌های DNA

در روش‌های مرسوم واکسیناسیون از اجزاء موجودات عفونت‌زا، موجودات کشته‌شده، یا سلول‌های سالم تضعیف‌شده برای تحریک تولید آنتی‌بادی استفاده شده است که ایمنی فعال در فرد را به‌وجود می‌آورند. این نوع واکسن‌ها به‌شکل موفقیت‌آمیزی سبب محافظت در برابر بیماری‌هایی نظیر فلج اطفال، آبله، سیاه سرفه، تب حصبه و دیفتری شده است. هرچند، ثابت شده است ایمونیزاسیون در برابر عوامل عفونی نظیر HIV و مالاریا مشکل می‌باشد. تأثیر جهانی عظیم این عوامل، استفاده بالقوه از عوامل دیگر در ترور بیولوژیکی، و بدتر شدن مشکلات مقاومت به آنتی‌بیوتیک، سبب افزایش تلاش‌ها برای تولید واکسن‌های جدید شده‌اند.

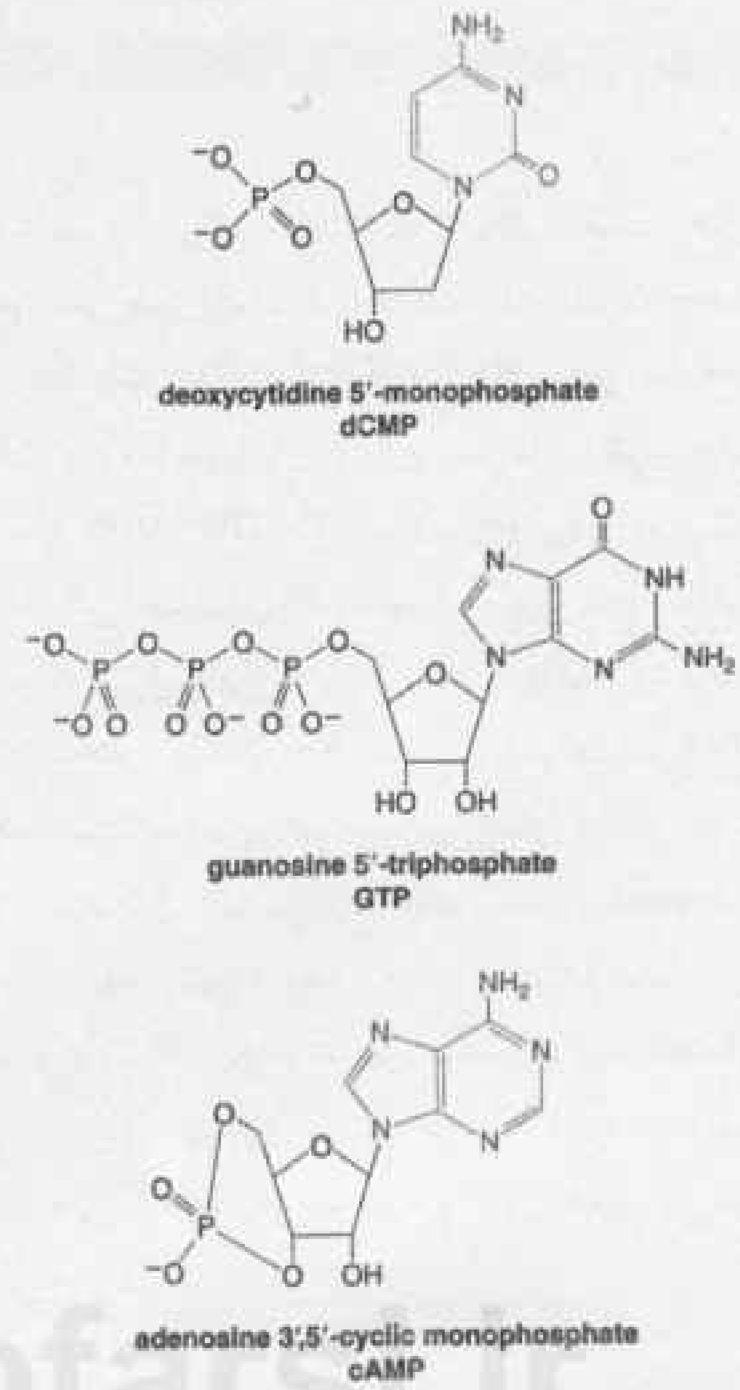
در یک رهیافت جدید ایمونیزاسیون، از DNA حاوی توالی از یک ژنوم عامل بیماریزا استفاده شده است. این DNA معمولاً یک پلاسمید باکتریایی است که طوری مهندسی شده است که حاوی توالی از یک پروتئین آنتی‌ژنیک مربوط به عامل بیماریزا باشد. این DNA می‌تواند وارد تعدادی از انواع سلول‌ها شده و می‌تواند در آنجا با استفاده از رونویسی سلولی و ماشین ترجمه بیان شود. از این نظر، واکسن‌های DNA بیشتر همانند ویروس‌ها عمل می‌کنند. هرچند، این ملکول‌های DNA تنها میزان بسیار محدودی از اطلاعات ژنتیکی را دارند و نمی‌توانند عفونت‌زا شوند. مکانیسم‌های برداشت و القاء پاسخ ایمنی هنوز نامشخص هستند. هرچند، نتایج امید بخشی در برابر ویروس‌ها، باکتری‌ها و میکروارگانیسم‌های انگلی مشاهده شده است. این رهیافت امید زیادی را برای تولید واکسن‌های مؤثر در برابر بیماری‌های سرکشی نظیر HIV/AIDS، سل و مالاریا به‌وجود آورده است.

واکسن‌های DNA ممکن است برای واکسیناسیون در برابر سرطان‌ها نیز مفید باشند. با وجود این‌که آنتی‌ژن‌هایی که توسط سلول‌های توموری عرضه می‌شوند، ایمونوژن‌های ضعیفی هستند، مطالعات مدل با استفاده از DNA پلاسمیدی، نتایج امیدبخشی را به‌دنبال داشته‌اند. موش‌های خانگی که به طریق خوراکی با پلاسمیدهای رشدکرده در باکتری‌های *Salmonella* تضعیف‌شده واکسینه شدند، توانستند رشد یک دوز کشنده سلول‌های کارسینومایی را آهسته و یا کاملا متوقف سازند. مرگ باکتری‌ها احتمالاً همراه با آزادسازی تعداد زیادی پلاسمید است که توسط سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن سیستم ایمنی برداشت می‌شوند. هم اکنون تعمیم این کار به انسان تحت بررسی قرار دارد.

هیدروکسیل موجود در قندهای این ترکیبات می‌توانند فسفریله شوند، ولی بازها فسفریله نمی‌شوند. نوکلئوتیدهای حاوی یک منواستر فسفات شامل نوکلئوزید منوفسفات‌ها هستند. برای مثال، داکسی سیتیدین ′۵ -منوفسفات (′۵- dCMP) ′۵ -نوکلئوتید داکسی سیتیدین است. وقتی بیش از یک فسفات وجود دارد، اینها می‌توانند از طریق یک اتصال انیدریدی اتصال به‌یکدیگر یابند که نتیجه آن استرهای دی-، -تری- و تترافسفات می‌باشد. ′۵- تری‌فسفات مربوط به گوانوزین، گوانوزین ′۵- تری‌فسفات (GTP) می‌باشد. دی‌استرهای فسفات نیز ممکن می‌باشند که شامل دو پیامبر دوم مهم، یعنی آدنوزین منوفسفات ′۳، ′۵ حلقوی (cAMP) و گوانوزین منوفسفات ′۳، ′۵ - حلقوی (cGMP)، می‌باشند.

خصوصیات فیزیکی نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها

حلالیت نوکلئوبازها، نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها در آب و در دامنه وسیعی از pH متفاوت می‌باشد. در مقادیر pH بیولوژیکی (pH ۸-۶) نوکلئوبازها و نوکلئوزیدها خنثی هستند. اولین pK_a منو و دی‌استرهای فسفات حدود ۱ است؛ به همین دلیل نوکلئوتیدها در مقادیر pH فیزیولوژیک دارای بار منفی هستند. دومین pK_a یک منواستر فسفاتی حدود ۶٫۵ است



شکل ۵-۲ ساختمان برخی نوکلئوتیدهای نمونه.

و در مقادیر pH خنثی، تعادلی بین منوآنیون و دی‌آنیون وجود دارد. نوکلئوتیدهای دارای دو یا سه فسفات چندین بار منفی دارند. وجود گروه‌های فسفات باردار بر روی نوکلئوتیدها، محل‌هایی را برای تعاملات الکترواستاتیک با محل‌های با بار مثبت موجود بر روی پروتئین‌ها و یون‌های فلزی فراهم می‌کنند.

نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها در دامنه وسیعی از مقادیر pH پایدار هستند. تحت شرایط شدیداً بازی، استرهای فسفات به آرامی هیدرولیز می‌شوند. پیوندهای N-گلیکوزیدی نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها تحت این شرایط پایدار هستند، ولی تحت شرایط اسیدی به‌میزان قابل توجهی ناپایدار می‌باشند. در درجه حرارت‌های بالا، پروتوناسیون بازهای پورینی (G و A) منجر به شکستن سریع پیوند بین قند و باز می‌شود. نوکلئوتیدها و نوکلئوزیدهای پیریمیدینی (C، T، و U) مقاومت بیشتری نسبت به محیط اسیدی دارند. شرایطی که پیوند گلیکوزیدی را می‌شکنند (برای مثال، اسید پرکلریک ۶۰٪ در 100°C) نیز منجر به تخریب قند می‌گردد.

ملکول‌هایی که حاوی بازهای پورینی و پیریمیدینی هستند، قویاً نور UV را جذب می‌کنند. پورین‌ها و نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدهای حاوی پورین ضرایب خاموشی مولی بیشتری نسبت به مشتقات پیریمیدینی دارند (نور را قوی‌تر جذب می‌کنند). طول موج UV که در آن حداکثر جذب نوری رخ می‌دهد، متفاوت بوده ولی معمولاً نزدیک به ۲۶۰ nm می‌باشد. به دلیل ضرایب خاموشی بالای نوکلئوبازها و غلظت بالای آنها در اسیدهای نوکلئیک، از جذب در ۲۶۰ nm می‌توان برای تعیین مقدار صحیح میزان اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) موجود در یک نمونه استفاده کرد. ادامه آنالیز و جداسازی نوکلئوبازها، نوکلئوزیدها، نوکلئوتیدها، و اسیدهای نوکلئیک را می‌توان با استفاده از انواع مختلف تکنیک‌ها، شامل کروماتوگرافی مایع با قدرت اجرایی بالا (HPLC)، کروماتوگرافی لایه نازک (TIC)، کروماتوگرافی کاغذی و الکتروفورز انجام داد.

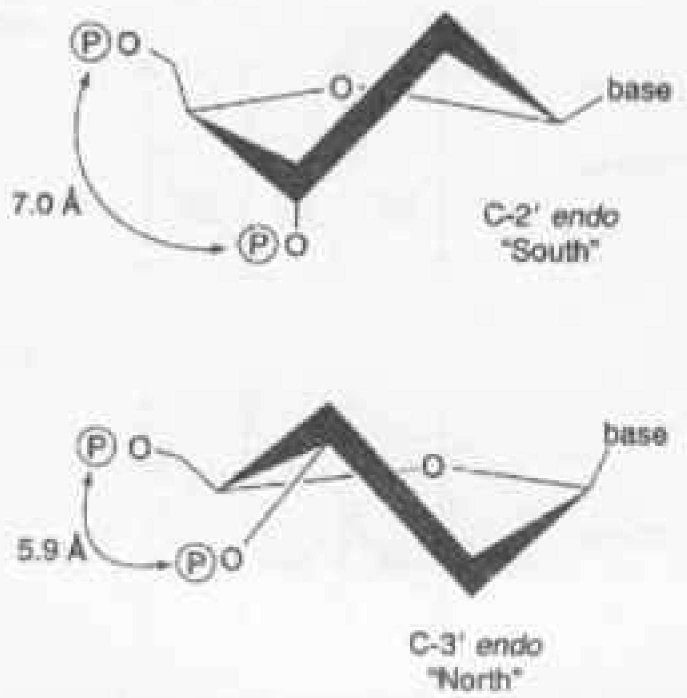
خصوصیات ساختمانی نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها

یکی از خصوصیات برجسته نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها، تعداد قابل توجه کونفورماسیون‌های احتمالی است که می‌توانند اتخاذ کنند. برخلاف حلقه‌های شش اتمی، حلقه‌های پنج اتمی شدیداً انعطاف‌پذیر هستند. پنج اتم حلقه موجود در یک قند پنتوز در یک صفحه قرار ندارند؛ به‌طور معمول یک یا دو اتم حلقه در خارج این صفحه قرار دارند. در حلقه‌های سیکلوپنتان، چندین کونفورماسیون پاکتی[1] و نیمه-صندلی[2] وجود دارد که سریعاً به یکدیگر تبدیل می‌شوند. به دلیل الگوی استخلافی حلقه پنتوز در نوکلئوزیدها، دو کونفورماسیون ارجح هستند (شکل ۶-۲). این سبک‌های **چروک‌شدگی قندی**[3] با قرارگیری کربن‌های ′۲ و ′۳ در بالای صفحه اتم‌های C4′-O4′-Cl′ تعریف می‌شوند. به‌طور قراردادی، بالا جهتی

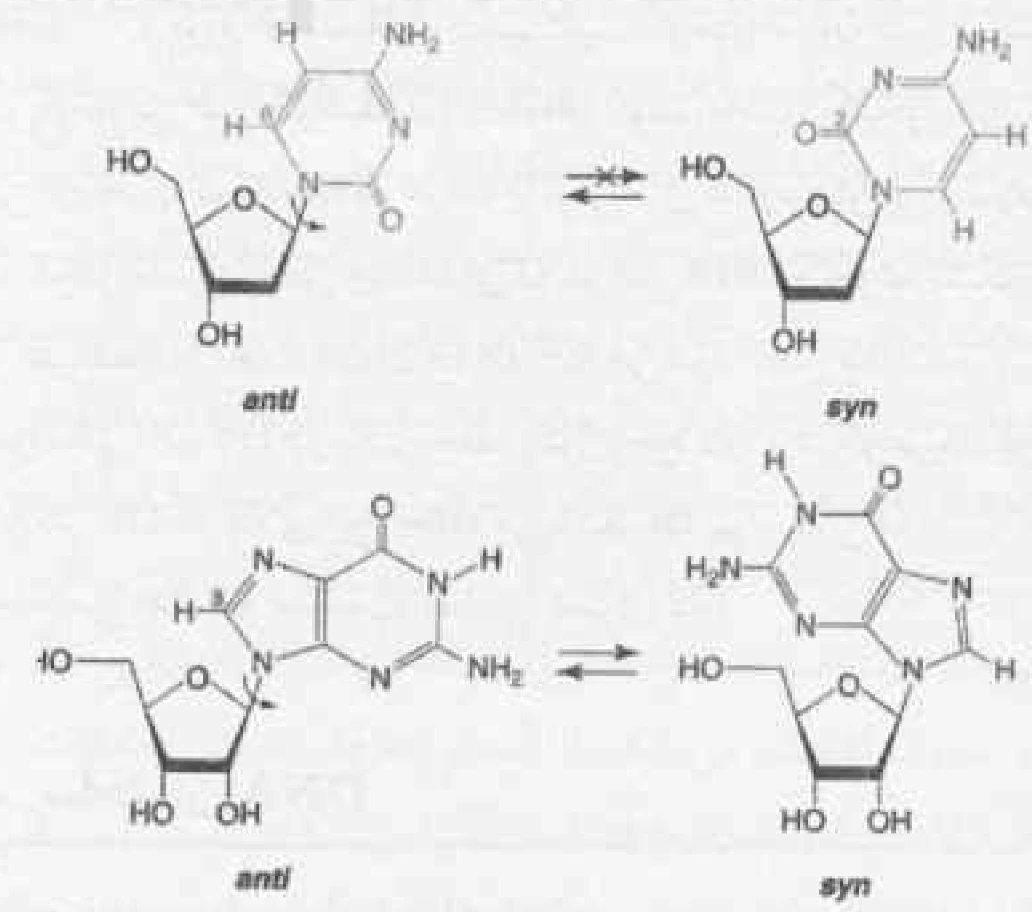
1. Envelope 2. Half-chair 3. Suger puckering

است که در آن باز و کربن ′۵ به خارج حلقه امتداد می‌یابند و سمت آندو[1] پنتوز نامیده می‌شود. در صورتی‌که کربن ′۲ در بالای حلقه پنتوز قرار گیرد، این کونفورماسیون ′C2– آندو می‌باشد. در شکل چروکیده معمول دوم، ′C3 به سمت آندو می‌باشد و ′C3– آندو نامیده می‌شود. قابل ذکر است که گروه‌های متصل به قند، موقعیت‌های بسیار متفاوتی در هر کدام از این کونفورماسیون‌ها دارند. برای مثال، در حالت چروکیده ′C2– آندو نسبت به ′C3– آندو، گروه‌های ′۵– و ′۳– فسفات بسیار دورتر می‌باشند. موقعیت پیوند گلیکوزیدی نیز در این دو کونفورماسیون به میزان قابل توجهی تغییر می‌یابد. کونفورماسیون‌های ′C2– آندو و ′C3– آندو در تعادل سریع قرار دارند. یک استخلاف الکترو نگاتیو در موقعیت ′۲ پنتوز، کونفورماسیون ′C3 – آندو را مساعدت می‌کند. لذا ریبونوکلئوتیدهای موجود در RNA این شکل چروکیده را ترجیح می‌دهند، زیرا یک گروه ′۲ –هیدروکسیل دارند. ′۲ – داکسی- ریبونوکلئوزیدهای DNA حاوی یک هیدروژن به‌جای گروه ′۲–هیدروکسیل هستند و کونفورماسیون ′C2– آندو ترجیح داده می‌شود.

بازهای مربوط به نوکلئوزیدها مسطح هستند. با وجود این که چرخش آزاد ممکن می‌باشد، ولی دو موقعیت باز نسبت به قند غالب می‌باشد (شکل ۷–۲). در پورین‌ها، **کونفورماسیون آنتی** اتم H8 را بالای قند قرار می‌دهد، در حالی‌که موقعیت این اتم در **کونفورماسیون سین** به دور از قند است و پورین دوحلقه‌ای بر روی قند قرار دارد. این دو

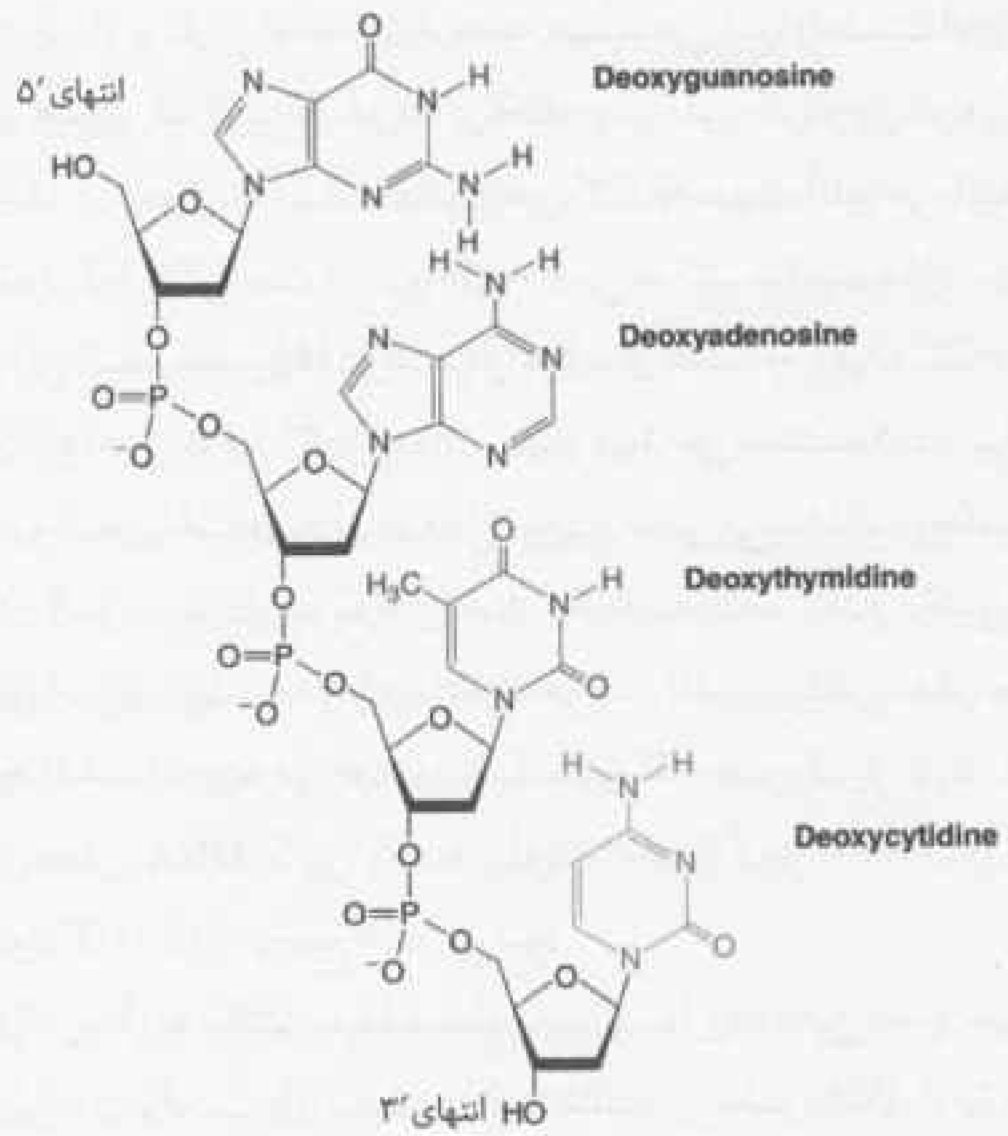


شکل ۶–۲ کونفورماسیون‌های ترجیحی قندهای پنتوز. دو کونفورماسیون تولید اختلافاتی در موقعیت نسبی باز (نسبت به قند) و در فاصله بین گروه‌های فسفات (P) ′3 و ′5 می‌کنند. نهایتاً، این اختلافات بر روی کونفورماسیون کلی کمپلکس مارپیچ- دوتایی اثر می‌گذارند.



شکل ۷–۲ کونفورماسیون‌های گلیکوزیدی پورین‌ها و پیریمیدین‌ها. در پیریمیدین‌ها، برخوردهای فضایی بین قند و O2 باز قویاً کونفورماسیون سین را نامساعد می‌کند. در پورین‌ها، هر دو کونفورماسیون آنتی و سین به‌راحتی به یکدیگر تبدیل می‌شوند و در اکثر موارد آنتی پایدارتر است. کونفورماسیون سین در گوانوزین ′۵– فسفات‌ها تثبیت می‌شود که دلیل آن تعاملات مساعد بین گروه NH_2 – 2 و اکسیژن‌های فسفات می‌باشد.

1. Endo



شکل ۸-۲ ساختمان یک پلی‌نوکلئوتید DNA. در اینجا یک تترانوکلئوتید نشان داده شده است. به طور کلی، اسیدهای نوکلئیک با کمتر از ۵۰ نوکلئوتید را اولیگونوکلئوتید و اسیدهای نوکلئوتید بلندتر را پلی‌نوکلئوتید گویند.

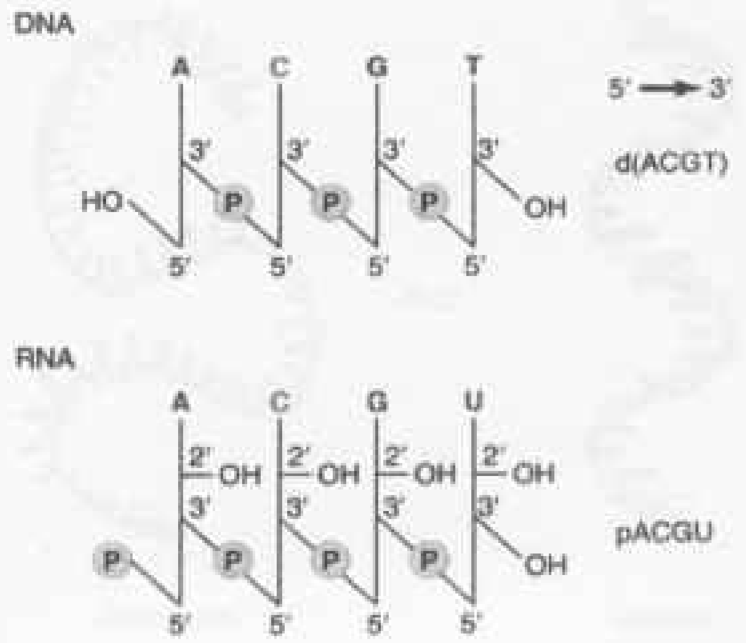
کونفورماسیون پورین‌ها سریعاً به یکدیگر تبدیل می‌شوند، ولی بیشتر موقعیت آنتی وجود دارد. هرچند، ′۵-نوکلئوزیدهای گوانینی استثناء هستند. در این موارد، تعاملات ترجیحی بین گروه NH_2-۲ و گروه ′۵-فسفات سبب تثبیت کونفورماسیون سین می‌شود. برای مثال، ′۲-داکسی‌گوانوزین ′۵-منوفسفات (dGMP)، کونفورماسیون گلیکوزیدی سین را ترجیح می‌دهد. این ارجحیت در DNA دو-رشته با توالی‌های متناوب گوانین و سیتوزین مشاهده شده است. کونفورماسیون سین ریشه‌های G در این DNA منجر به تشکیل یک مارپیچ چپ‌گردان غیرمعمول، تحت عنوان Z-DNA می‌شود (ص ۵۵). در پیریمیدین‌ها با کونفورماسیون آنتی، اتم H6 در بالای حلقه پنتوز وجود دارد و در کونفورماسیون گلیکوزیدی سین اتم بزرگتر O2 در بالای این حلقه می‌باشد. لذا پیریمیدین‌ها بیشتر کونفورماسیون آنتی را ترجیح می‌دهند که ممانعت فضایی کمتری دارد.

۲-۳ • ساختمان DNA

ساختمان و خصوصیات پلی‌نوکلئوتیدی

اسیدهای نوکلئیک رشته‌هایی از نوکلئوتیدهایی هستند که از طریق پیوندهای **فسفودی‌استری** به یکدیگر اتصال دارند (شکل ۸-۲). طول این رشته‌ها به میزان قابل توجهی، از دو ریشه تا صدها میلیون ریشه، متفاوت است. به‌طور شاخص، رشته‌های اسیدهای نوکلئیک حاوی ۵۰ یا تعداد کمتری نوکلئوتید را **اولیگونوکلئوتید** گویند، در حالی که انواع بلندتر را پلی-

نوکلئوتید گویند. گروه ′۵- هیدروکسیل یک ریشه از طریق پیوند **فسفودی استری** به گروه ′۵- هیدروکسیل بعدی اتصال دارد. اتصالات بین دو گروه ′۵- هیدروکسیل یا دو گروه ′۳- هیدروکسیل در طبیعت مشاهده نمی‌شوند. **جهت** این پیوند به معنی آن است که اولیگونوکلئوتیدهای خطی یک انتها دارند که به یک ′۵- هیدروکسیل ختم شده و دیگری به یک ′۳- هیدروکسیل ختم می‌شود. این دو انتها را به ترتیب **انتهای ′۵** و **انتهای ′۳** می‌نامند. پلی‌نوکلئوتیدهای حلقوی هیچ انتهای آزادی ندارند و از اتصال انتهای ′۵ یک پلی‌نوکلئوتید به انتهای ′۳ خود از طریق یک پیوند فسفودی استری به وجود می‌آیند. در هر دو پلی نوکلئوتید خطی و حلقوی، اسکلت قند- فسفودی استر کاملاً یکنواخت است و تنوع شیمیایی اساساً از بازها حاصل می‌شوند. توالی بازها برای هر ملکول یک هویت شیمیایی بی‌همتا به‌وجود می‌آورد (شکل ۹-۲). این آرایش همانند آرایش موجود در پلی‌پپتیدها و پروتئین‌ها است (ص ۱۰۸) که در آنها تغییر در ساختمان شیمیایی اساساً حاصل هویت زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه است.



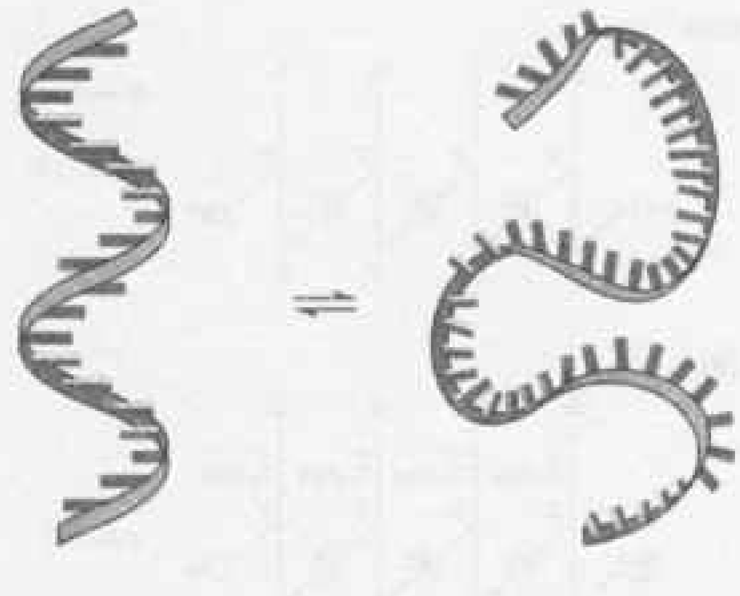
شکل ۹-۲ نمایش کوتاه شده ساختمان اولیگونوکلئوتیدها. قرارداد مورد استفاده در این نوع نوشتن ساختمان یک اولیگو- یا پلی‌نوکلئوتید شامل یک خط عمودی برای اشاره به بخش قندی با موقعیت ′۵- HO قند در پایین این خط و ′3- HO (و در صورت وجود، ′۲- HO) در موقعیت میانی می‌باشد. خطوط متصل‌کننده موقعیت‌های ′۳ و ′۵ اشاره به پیوند ′۳ ← ′۵ فسفودی استری، و P موجود در سمت چپ یا راست خط عمودی برای اشاره به‌ترتیب به یک استر ′۵-فسفات و ′۳- فسفات می‌باشند باز براساس موقعیت ابتدایی خود در بالای خط مشخص می‌شود. در شکل دیگر کوتاه‌نویسی، از تک- حرف برای بازها استفاده می‌شود که در جهت ′۵ ← ′۳ از چپ به راست نوشته می‌شود. گروه‌های فسفودی‌استر داخلی فرض‌شده هستند و فسفات‌های انتهایی با یک (p) نشان داده می‌شوند. توالی‌های اولیگو- نوکلئوتیدی حاوی قندهای داکسی‌ریبوز توسط (d) ابتدایی مشخص می‌شوند.

کونفورماسیون‌های پلی‌نوکلئوتیدی

بازها بیشترین نقش را در کونفورماسیون پلی‌نوکلئوتییدها دارند. لبه‌های بازها حاوی اتم‌های نیتروژن و اکسیژن (گروه‌های NH_2–، –N=، و O=) هستند که می‌توانند با گروه‌های قطبی دیگر یا ملکول‌های آب اطراف تعامل کنند. هر چند، صفحه حلقه‌ها قادر به ایجاد چنین تعاملاتی نیستند و تمایل به دوری از آب دارند. در عوض، این صفحات با یکدیگر تعامل نموده و تولید یک کونفورماسیون متراکم می‌کنند. **ایجاد تراکم بازی**[1] سبب کاهش ناحیه سطحی آبگریز شده و می‌بایست توسط ملکول‌های قطبی آب حل شوند. آزادسازی این ملکول‌های آب به داخل حجم بزرگ حلال از نظر آنتروپی مساعد است. آرایش متراکم بازها از طریق تعاملات الکترونیکی مساعد (نیروهای واندروالس) پایدار می‌گردد. همانند سایر سیستم‌های آروماتیک، بازها حاوی اربیتال‌های π- شدیداً دلوکالیزه در بالا و پایین صفحات مربوط به حلقه‌های خود هستند. این تراکم الکترونی می‌تواند توسط دوقطبی‌های مجاور قطبی شود. سپس دوقطبی القاء شده حاصل می‌تواند به شکل مساعدی با گروه قطبی‌کننده تعامل کند. این تعاملات ضعیف توسط نیروهای تفرقی لندن[2] (دوقطبی القاء شده توسط دوقطبی القاء شده[3]) افزایش می‌یابند. از آنجایی‌که قدرت این تعاملات الکترونیکی شدیداً وابسته به فاصله هستند، هیچ فضای خالی بین بازهای متراکم‌شده باقی نمی‌ماند.

پلی‌نوکلئوتیدها کونفورماسیون‌هایی را اتخاذ می‌کنند که ایجاد تعاملات تراکمی مساعد بین بازهای مجاور را به حداکثر می‌رسانند. فشارهای وارده از طرف ساختمان اسکلت قند- فسفودی‌استری، ایجاد ساختمان‌های مارپیچی را مساعدت می‌کنند (شکل ۱۰-۲). پایداری کلی این ساختمان‌های مارپیچی وابسته به عوامل است که شامل تراکم بازی

1. Base stacking
2. London dispersion forces
3. Induced dipole-induced-dipole



شکل ۱۰-۲ کونفورماسیون‌های متراکم‌شده و فنری - تصادفی یک پلی‌نوکلئوید تک - رشته. نوار مارپیچی نمایش از اسکلت قند - فسفات پلی‌نوکلئوتید می‌باشد. بازها به‌صورت خطوطی نمایش داده شده‌اند که درتماس با مجاوران خود هستند. بازهای متراکم‌نشده یک ساختمان انعطاف‌پذیر تولید می‌کنند که در آن بازها موقعیت تصادفی دارند.

وابسته به توالی، pH، غلظت نمکی و درجه حرارت هستند. برای مثال، برخی پلی‌نوکلئوتیدهای سنتتیک شامل پلی (C) و پلی (A)، تولید مارپیچ‌های راست‌گردانی می‌کنند که در آنها بازها شدیداً متراکم هستند. بسیاری از پلی‌پپتیدهای دیگر با کونفورماسیون **فنری-تصادفی**[1] بسیار نامنظم باقی می‌مانند.

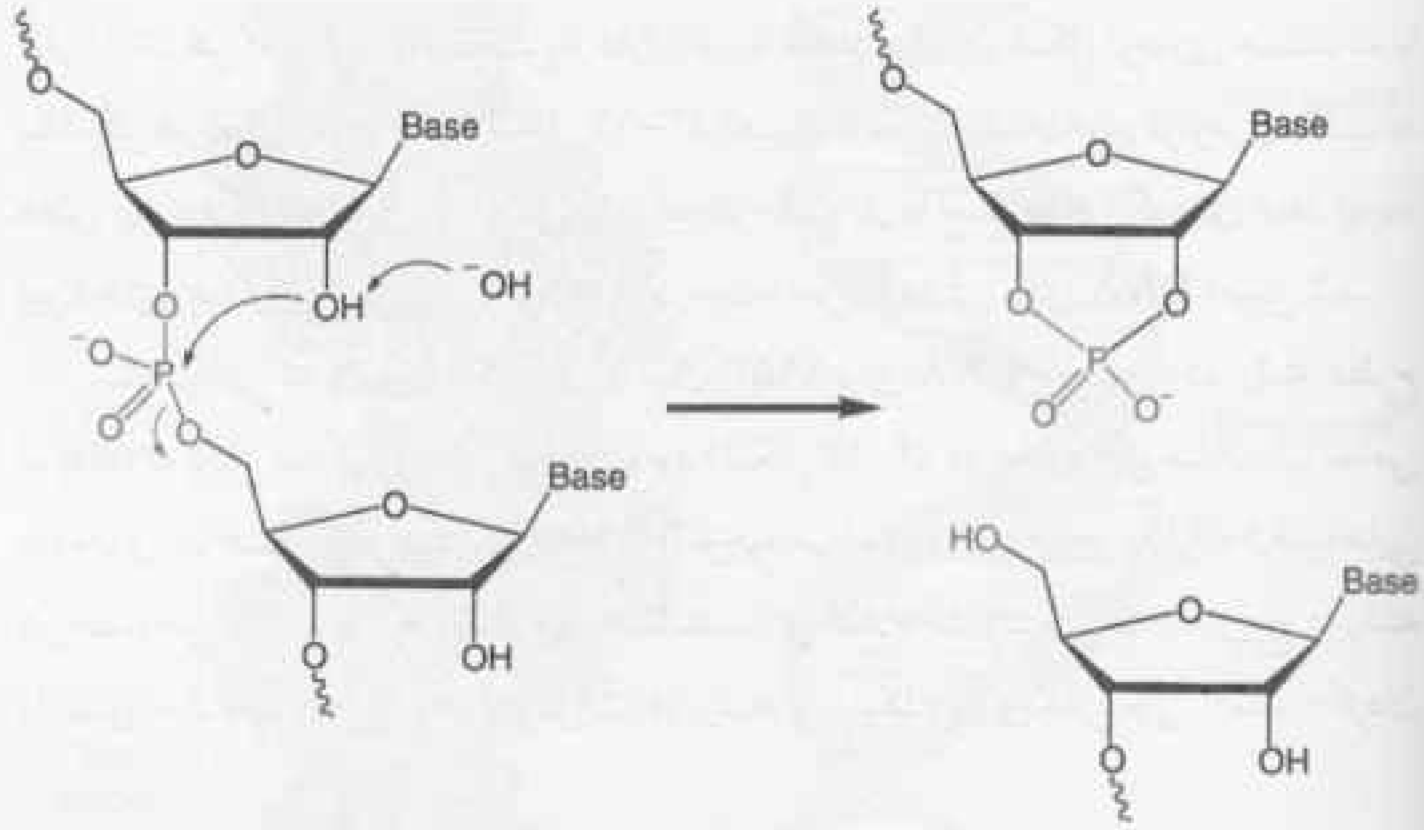
پلی‌نوکلئوتیدهای بزرگ ممکن است برحسب توالی موضعی، نواحی مارپیچی و نامنظم داشته باشند. خصوصیات محلول نیز در تعیین اتخاذ کونفورماسیون‌های متراکم توسط پلی‌نوکلئوتیدها نقش دارند. برای مثال، غلظت‌های بالای کاتیون‌ها، به‌خصوص یون‌های چند ظرفیتی نظیر Mg^{2+} از طریق محافظت از بارهای مربوط به گروه‌های فسفودی‌استر موجود در اسکلت، کونفورماسیون مارپیچی را تثبیت می‌کنند. بدون این اثر محافظتی، بارهای منفی موجود بر روی فسفات‌ها، مارپیچ را از طریق دفع الکترواستاتیک ناپایدار خواهند کرد.

پایداری اسکلت پلی‌نوکلئوتیدی

پلی‌نوکلئوتیدها در محلول‌های آبی و در نزدیکی pH خنثی نسبتاً پایدار هستند. نیمه-عمر برآوردشده هیدرولیز اتصالات فسفودی‌استری در DNA حدود ۲۰۰ میلیون سال می‌باشد. این پایداری زیاد سبب شده تا DNA برای ذخیره طولانی-مدت اطلاعات ژنتیکی مناسب باشد. برعکس، RNA بیشتر در معرض هیدرولیز قرار دارد. وجود گروه ′۲-هیدروکسیل یک نوکلئوفیل داخلی را برای ترانس‌استریفیکاسیون اتصال ′۳، ′۵-فسفودی‌استر فراهم می‌سازد (شکل ۱۱-۲). نتیجه برش اسکلت پلی‌نوکلئوتیدی و تولید یک فسفودی‌استر ′۲، ′۳-حلقوی بر روی یک قطعه و یک گروه ′۵-هیدروکسیل بر روی قطعه دیگر می‌باشد. ناپایداری هیدرولیتیکی RNA سبب شده تا RNA برای عمل به عنوان ماده ژنتیکی کمتر از DNA مناسب باشد.

در حالی که اسکلت DNA نسبتاً در برابر هیدرولیز پایدار است، ولی آنزیم‌های (**نوکلئازهای**) متعددی برش فسفودی استر را کاتالیز می‌کنند. این نوکلئازها براساس نوع پلی-نوکلئوتیدی که هیدرولیز می‌کنند و پیوندهای اختصاصی که می‌شکنند، مشخص می‌گردند. اگزونوکلئازها آخرین ریشه نوکلئوتیدی را در انتهای ′۵ یا ′۳ یک پلی‌نوکلئوتید می‌شکنند. برداشت مرحله به مرحله نوکلئوتیدها از یک انتهای یک پلی‌نوکلئوتید می‌تواند منجر به تجزیه کامل آن شود. آندونوکلئازها پیوندهای فسفودی‌استری را می‌شکنند که در داخل پلی‌نوکلئوتیدها وجود دارند. این آنزیم‌ها نیاز به انتهای آزاد ندارند؛ لذا قادر به شکستن پلی‌نوکلئوتیدهای حلقوی نیز هستند. اگزونوکلئازهایی نظیر DNase I و DNase II سبب هیدرولیز DNA در توالی می‌شوند که کمتر انتخابی است. **آندونوکلئازهای محدودکننده**[2] توالی‌های بسیار اختصاصی را شناسایی و می‌شکنند. نوکلئازها همچنین نسبت به ساختمان کلی نوکلئوتیدها ویژگی توالی را دارند. برای مثال، برخی نوکلئازها بر روی هر دو نوع پلی‌نوکلئوتید تک- و

1. Random-coil 2. Restriction endonucleases



شکل ۱۱-۲ تسریع هیدرولیز RNA با همکاری گروه ۲'-HO. حمله نوکلئوفیلی درون ملکولی توسط گروه ۲'-HO ریبوز به‌میزان زیادی سرعت تجزیه هیدرولیتیک اسکلت فسفودی استری، به‌خصوص تحت شرایط پایه، را افزایش می‌دهد. فسفودی‌استر ۲'،۳'-حلقوی می‌تواند بعداً با آب یا هیدروکسید واکنش نموده و تولید مخلوطی از منواسترهای ۲'- و ۳'- فسفات شود.

دو- رشته اثر می‌کنند، در حالی که بقیه این دو ساختمان را تمایز می‌دهند. برخی منحصراً بر روی DNA یا RNA اثر می‌کنند، در حالی که بقیه تنها بر روی یک نوع پلی‌نوکلئوتید اثر دارند.

DNA دورشته- مارپیچی

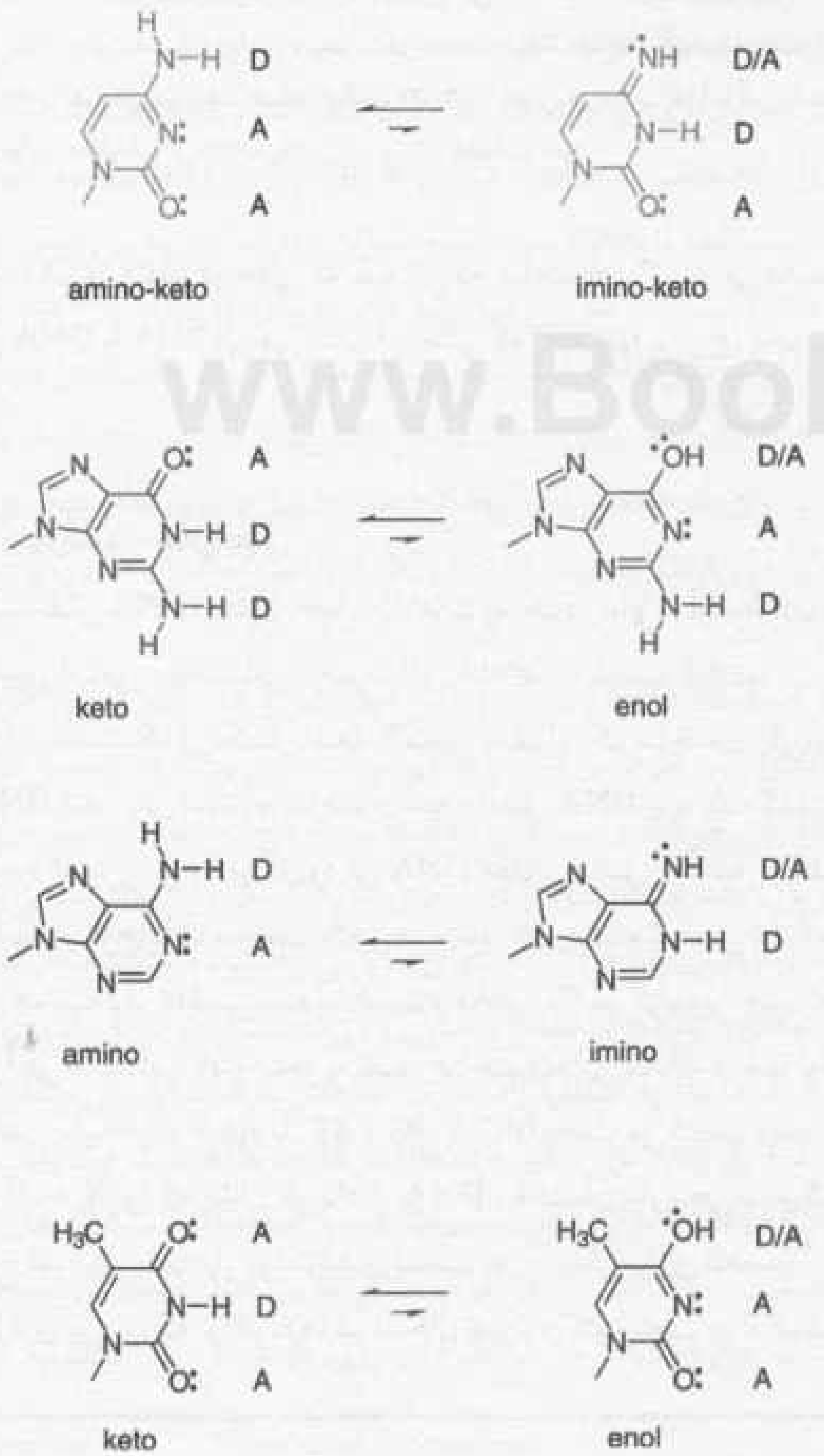
با شناخت نقش DNA به‌عنوان حامل اطلاعات ژنتیک در اوایل و اواسط قرن بیستم، تحقیقات برای تعیین اساس ساختمانی ذخیره‌سازی اطلاعات شدت گرفت.

تجارب سنتتیک و انکسار اشعه X منجر به قبول یک ساختمان پلی‌نوکلئوتیدی خطی برای DNA شد. برای استنتاج ساختمان سه- بُعدی DNA، سه یافته کلیدی وجود داشت. اولین مورد تعیین این واقعیت بود که DNA مقادیر برابری از چهار نوکلئوتید را ندارد و مقادیر آنها در موجودات مختلف متغیر می‌باشد. هرچند، مشخص شد که فراوانی داکسی آدنوزین همیشه برابر داکسی‌تیمیدین است و فراوانی داکسی‌گوانوزین همیشه معادل داکسی- سیتیدین می‌باشد. این یافته منجر به تصور ساختمان‌هایی شد که در آنها نوکلئوتیدها به‌طور اختصاصی با یکدیگر (dA با dT و dG با dC) جفت می‌شوند. دومین مورد داده‌های انکسار اشعه X بود که نشان می‌دادند DNA ساختمان **مارپیچی- دورشته** و تقارن دارد که مطرح نمود دو رشته پلی‌نوکلئوتیدی نسبت به یکدیگر **موازی ناهمسو**[1] هستند. سومین یافته کلیدی این بود که نوکلئوبازها در اشکال **توتومری** کتو و آمینو و نه اشکال انول و ایمینو

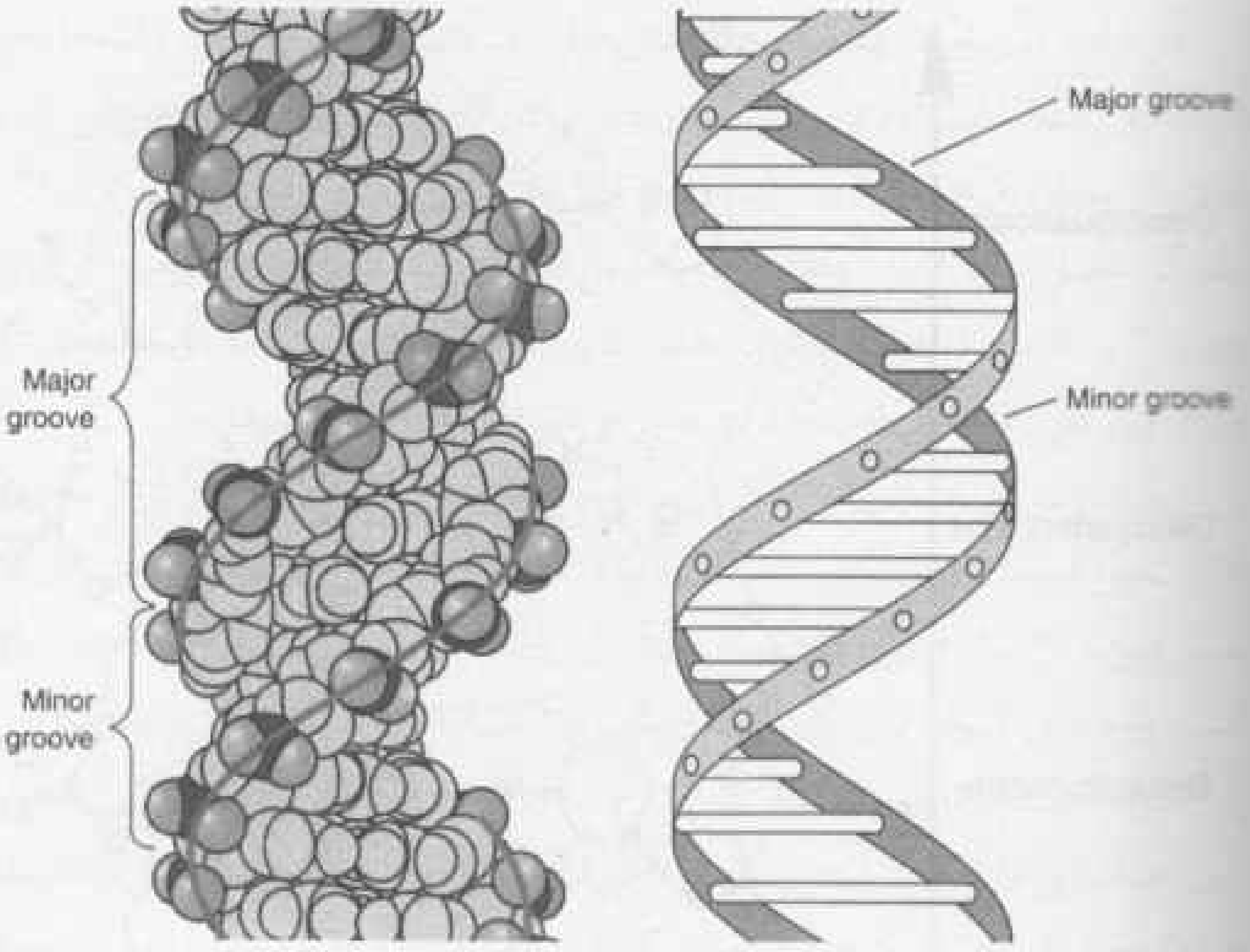
1. Antiparallel

قرار دارند. هر کدام از چهار نوکلئوباز دارای دو یا تعداد بیشتری شکل توموری هستند که با یکدیگر در تعادل می‌باشند (شکل ۱۲-۲). تعیین غلط ساختمان‌های توتومری غالب به معنی این بود که محققین در تلاش برای ایجاد جفت باز با استفاده از الگوهای غلط ایجاد پیوندهای هیدروژنی بودند. با تومرهای درست، سریعاً مدلی برای DNA تعیین شد.

ساختمانی که **واتسون و کریک** در سال ۱۹۵۳ برای DNA مارپیچی دو رشته مطرح نمودند، به دلیل سادگی و تقارن، جذاب بود (شکل ۱۳-۲). به علاوه، این ساختمان تمامی داده‌های ساختمانی موجود برای DNA را توجیه می‌نمود و فوراً منجر به ارائه فرضیه‌هایی در خصوص مکانیسم ذخیره‌سازی و همانندسازی اطلاعات ژنتیکی شد. مارپیچ دورشته واتسون-کریک را می‌توان به‌صورت دو رشته پلی‌نوکلئوتیدی مارپیچی راست-گردان

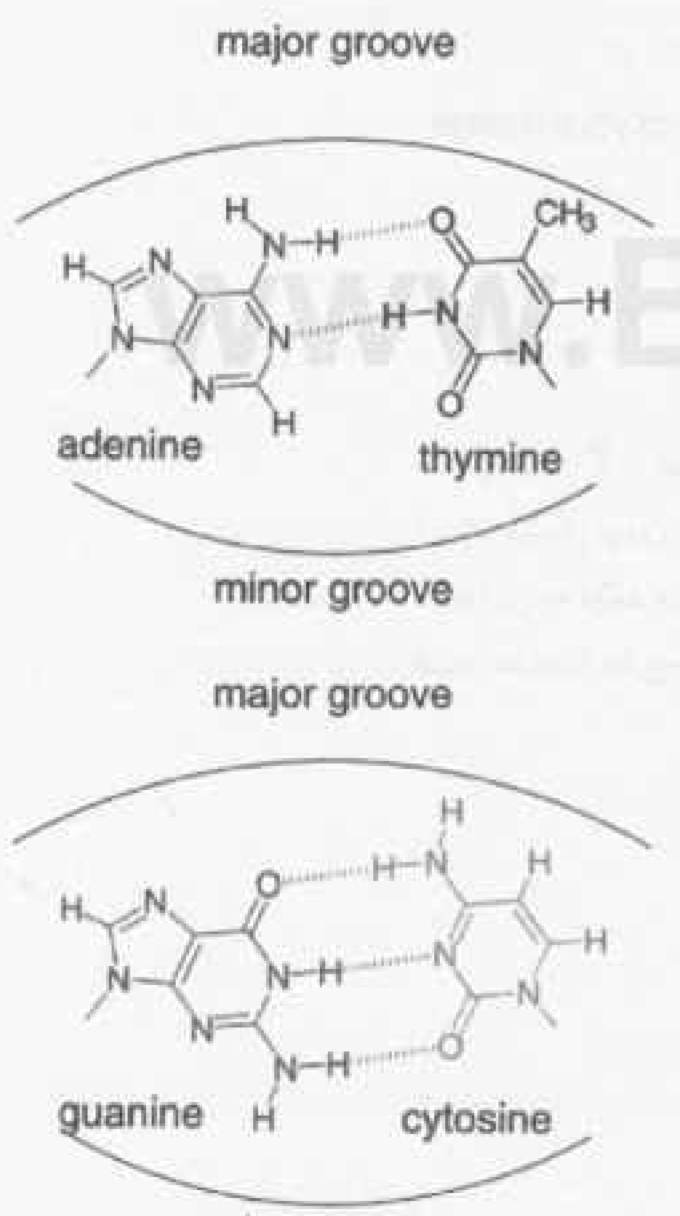


شکل ۱۲-۲ اشکال توتومری نوکلئوبازها. الگوی گروه‌های دهنده (D) و پذیرنده (A) پیوندهای هیدروژنی برحسب توتومر باز موجود تغییر می‌کند. در اینجا اشکال توتومری غالب (چپ) و یکی از اشکال دیگر هر باز (راست) نشان داده شده‌اند. الگوی ایجاد پیوند هیدروژنی برای هر توتومر نشان داده شده است؛ ابهام در موقعیت‌های OH- و NH= توتومرهای جزیی از چرخش یا ایزومریسم این گروه‌ها حاصل می‌شود. نسبت تعادلی شکل غالب نسبت به تمامی موارد دیگر بیش از ۹۹:۱ است.



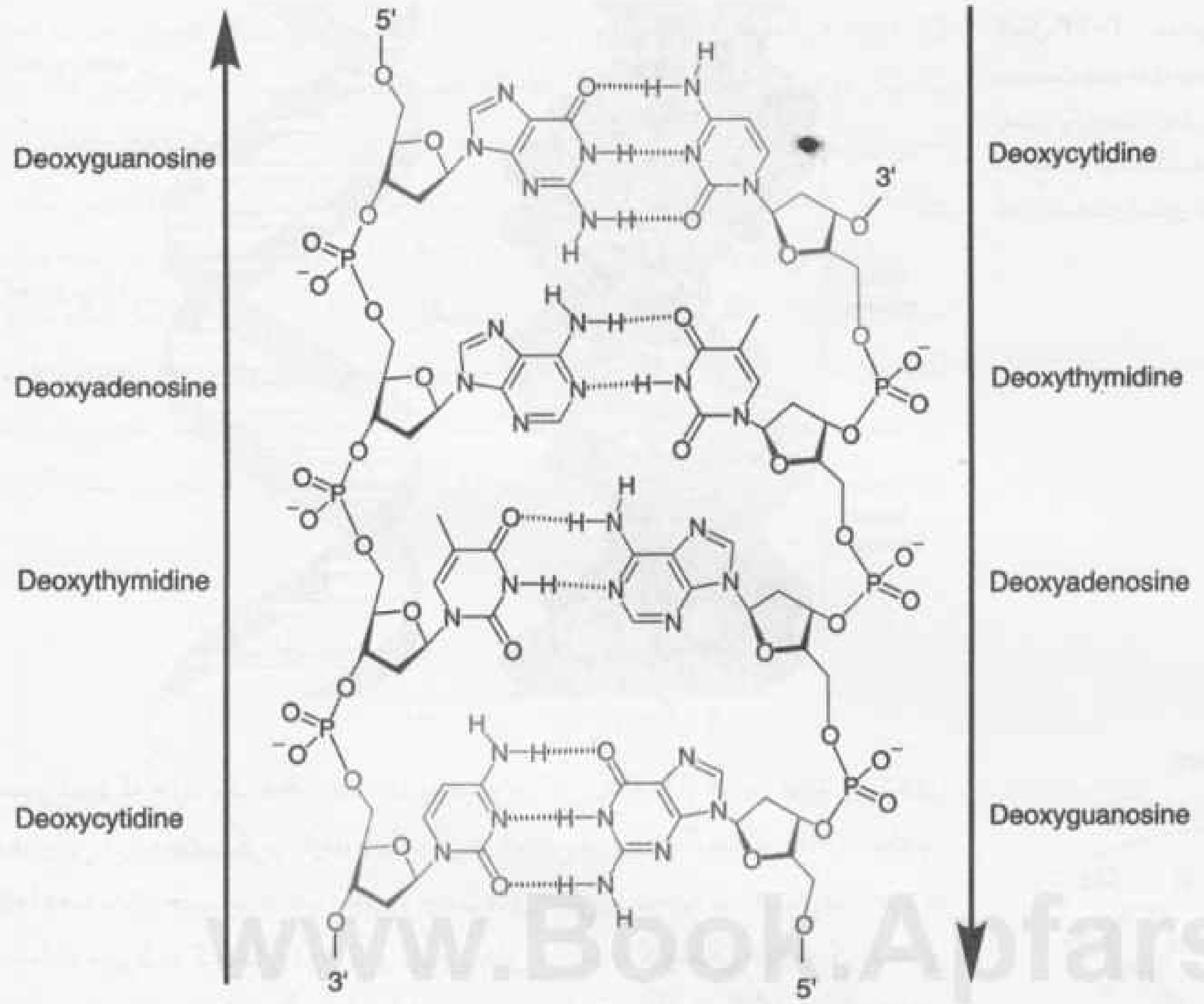
شکل ۲-۱۳ مدل واتسون-کریک برای DNA. در سمت چپ مدل فضا-پُرکن DNA؛ در سمت راست یک مدل رویانی ایده‌آل. بازها در داخل ماریپچ متراکم شده‌اند، درحالی‌که اسکلت آبدوست قند-فسفودی‌استری در خارج قرار دارد.

تصور نمود که حول یک محور مشترک پیچیده‌اند. این رشته‌ها از طریق تولید پیوندهای هیدروژنی در لبه‌های آبگریز بازها، با یکدیگر در تماس می‌باشند. گروه‌های $N-H$ نوکلئو-بازها دهنده‌های خوب پیوند هیدروژنی و جفت‌های الکترونی موجود در اکسیژن‌های هیبرید شده sp^2 مربوط به گروه‌های $C=O$ و نیتروژن‌های مربوط به گروه‌های $-N=$، گیرنده‌های خوب پیوند هیدروژنی هستند. جفت‌شدن زمانی رخ می‌دهد که یک گیرنده و یک دهنده در موقعیت تشکیل یک پیوند هیدروژنی قرار می‌گیرند. این پیوندها بین ریشه‌های پورینی در یک رشته و ریشه‌های پیریمیدینی در رشته دیگر امتداد یافته و این تطابق دهنده‌ها و گیرنده‌های پیوند هیدروژنی منجر به دو نوع **جفت باز** می‌شود: آدنین-تیمین و گوانین-سیتوزین (شکل ۲-۱۴). یکی از نتایج مستقیمی که از این ویژگی‌ها در ایجاد پیوند هیدروژنی حاصل می‌شود این است که **DNA دو-رشته**[1] **(dsDNA)** می‌بایست نسبت‌هایی از نوکلئوتیدهایی را داشته باشد که موافق با مشاهدات تجربی ($dA=dT$ و $dG=dC$) می‌باشند. بالاخره، هندسه جفت‌های بازی dA/dT و dG/dC منجر به فواصل $Cl'-Cl'$ مشابه (حدود $10{,}6$ Å) و جهت‌گیری‌های مشابه پیوند گلیکوزیدی می‌شود. این **هم‌شکلی ساختمانی**[2] به معنی آن است که هر کدام از چهار جفت باز احتمالی ($dA-dT$، $dT-dA$، $dC-dG$، $dG-dC$، و $dC-dG$) را بتوان بدون ایجاد تغییر قابل توجه در ساختمان اسکلت، در محل قرار داد؛ به این نکته توجه داشته باشید که چطور این ترتیب منجر به جایگزینی احتمالی یک جفت باز با هر جفت باز دیگر می‌شود که خود در شناخت نحوه تغییر اطلاعات DNA، جهش، مهم است.



شکل ۲-۱۴ جفت‌های بازی واتسون-کریک. جفت‌های بازی انتخابی بین آدنین و تیمین و بین گوانین و سیتوزین تشکیل می‌شوند. به تولید دو پیوند هیدروژنی در جفت باز A-T و سه پیوند هیدروژنی در جفت باز G-C توجه کنید.

1. Double-stranded DNA   2. Structural isomorphism



شکل ۱۵-۲ تولید پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل در DNA دو- رشته. تعامل بین رشته‌های پلی‌نوکلئوتیدی شدیداً انتخابی است. مکمل بودن بستگی به نه تنها عوامل هندسی که امکان قرارگیری مناسب بین بازهای مکمل دو رشته را فراهم می‌سازند، بلکه همچنین به تولید پیوندهای هیدروژنی بین بازهای مکمل دارد. به جهت‌گیری موازی ناهمسوی رشته‌ها در یک DNA دو- رشته توجه کنید. هندسه مارپیچ‌ها مانع صف‌بندی موازی نمی‌گردد، ولی چنین آرایشی در DNA یافت نمی‌شود.

ارتباط بین بازها در رشته‌های مخالف موجود در مارپیچ دورشته با عنوان **مکمل بودن**[1] شرح داده می‌شود. بازها از این نظر مکمل هستند که هر نوکلئوباز یک رشته از نظر شکل و ایجاد پیوند هیدروژنی با یک باز مکمل موجود در رشته دیگر تطابق دارد (شکل ۱۵-۲). برای مثال، برای هر آدنینی که به‌سمت محور مارپیچ دوتایی امتداد یافته است، لازم است یک تیمین از رشته مخالف به سمت این محور امتداد یافته تا با ایجاد پیوند هیدروژنی، فضای بین دو رشته را دقیقاً پرکند. نه سیتوزین و نه گوانین نمی‌توانند دقیقاً در فضای عرضی موجود در برابر آدنین طوری قرار بگیرند که امکان تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین دو رشته وجود داشته باشد. این ویژگی‌های ایجاد پیوند- هیدروژنی تضمین می‌کند که کل توالی بازی یک رشته مکمل رشته دیگر باشد.

1. Complementarity

در خارج مارپیچ دورشته، اسکلت‌های قند- فسفات مربوط به اجزاء رشته‌ها وجود دارند. دو رشته با جهت‌های مخالف در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند؛ در صورتی که دو نوکلئوباز مجاور موجود در یک رشته، برای مثال، تیمین و سیتوزین، با جهت ′5 به ′3 به یکدیگر متصل شده باشند، نوکلئوبازهای مکمل آنها در رشته دیگر، یعنی آدنین و گوانین، با جهت ′3 به ′5 متصل خواهند بود. این صف‌بندی موازی ناهمسو سبب ایجاد یک همبستگی پایدار بین دو رشته در جهت حذف سایر آرایش‌های موازی می‌شود.

پیچیدن دو رشته به دور یکدیگر سبب ایجاد ساختمانی می‌شود که دو شیار مارپیچی متفاوت بین اسکلت‌های قندی-فسفاتی دارد (شکل ۱۳-۲ و ۱۴-۲). **شیار اصلی (بزرگ)**[1] بسیار پهن‌تر از **شیار فرعی (کوچک)**[2] است. این اختلاف به‌دلیل هندسه جفت‌های بازی است: پیوندهای گلیکوزیدی بین بازها و پنتوز اسکلت، مستقیماً در مقابل یکدیگر آرایش پیدا نکرده‌اند، بلکه به سمت شیار کوچک جا‌به‌جا شده‌اند. نکته قابل توجه این است که بدون جداسازی مارپیچ دورشته، با نگاه به‌داخل این شیارها امکان تشخیص توالی نوکلئوتیدی DNA وجود دارد. هر باز همیشه اتم‌های یکسانی را در هر کدام از این شیارها در مارپیچ دو رشته در معرض قرار می‌دهد. لذا این اتم‌ها یک ابزار مهم برای شناسایی توالی-اختصاصی DNA توسط پروتئین‌ها و ملکول‌های کوچک فراهم می‌سازند. برای مثال، N7 پورین‌ها همیشه در شیار بزرگ به نمایش گذاشته می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یک گیرنده پیوند هیدروژنی در تعاملات بین گروه‌های دهنده موجود در پروتئین‌ها عمل کند (شکل ۱۴-۲). به‌طور مشابه، گروه $2-NH_2$ خارج‌حلقه‌ای گوانین همیشه به‌داخل شیار کوچک امتداد می‌یابد و می‌تواند یک مانع فضایی در برابر اتصال ملکول‌های کوچک به وجود آورد.

عوامل پایدارکننده DNA دورشته- مارپیچی

تعاملات تراکم‌پذیری[3] که ساختمان‌های مارپیچی پلی‌نوکلئوتیدهای تک-رشته را پایدار می‌کنند نیز در تثبیت مارپیچ دو رشته نقش ساختمانی دارند. جدایی مرکز آبگریز نوکلئو-بازهای متراکم شده و بخش خارجی آبدوست گروه‌های قند فسفات باردار در مارپیچ دو رشته به مراتب بهتر از مارپیچ‌های تک-رشته انجام می‌شود. تمایل ایجاد تراکم‌پذیری پلی‌نوکلئوتیدهای تک-رشته را می‌توان نتیجه تمایل بازها برای کاهش تماس خود با آب دانست. مارپیچ دو-رشته، اساساً به‌دلیل برداشت نوکلئوبازها از محیط آبی و فراهم‌سازی امکان انحلال شدید اسکلت فسفات آبگریز توسط آب، یک آرایش مساعدتری است.

تعاملات تراکم‌پذیری، ترکیبی از نیروهای آبگریز و تعاملات و اندروالس، شامل ۶۱-۱۶ کیلوژول در هر مول[kJ/mol] (۱۵-۴ کیلوکالری در هر مول[kcal/mol]) انرژی تثبیت برای هر جفت باز مجاور می‌باشند (جدول ۱-۲). تثبیت بیشتر مارپیچ دورشته بواسطه شبکه‌های وسیع پیوندهای هیدروژنی تعاونی فراهم می‌گردد. عموماً این پیوندها ضعیف

1. Major groove 2. Minor groove 3. Stacking interactions

جدول ۱-۲ • انرژی‌های مربوط به تراکم‌پذیری جفت-بازی

جفت‌های بازی	انرژی‌های تراکم‌پذیری در هر جفت	
دی‌نوکلئوتیدی	*kJ/mol*	*kcal/mol*
(GC)•(GC)	−۶۱٫۰	−۱۴٫۶
(AC)•(GT)	−۴۴٫۰	−۱۰٫۵
(TC)•(GA)	−۴۱٫۱	−۹٫۸۱
(CG)•(CG)	−۴۰٫۵	−۹٫۶۹
(GG)•(CC)	−۳۴٫۶	−۸٫۲۶
(AG)•(CT)	۲۸٫۴	−۶٫۷۸
(TG)•(CA)	−۲۷٫۵	−۶٫۵۷
(AT)•(AT)	−۲۷٫۵	−۶٫۵۷
(AA)•(TT)	−۲۲٫۵	−۵٫۳۷
(TA)•(TA)	−۱۶٫۰	−۳٫۸۲

(۱۰-۳۰ kJ/mol یا ۳-۷ kcal/mol) می‌باشند، و به دلیل فشارهای هندسی موجود در داخل مارپیچ دورشته، در DNA حتی ضعیف‌تر (۸-۱۲ kJ/mol یا ۲-۳ kcal/mol) نیز هستند. ممکن است به‌نظر برسد که پیوندهای هیدروژنی بین نوکلئوبازها می‌توانند در مجموع سبب تثبیت اساسی مارپیچ دورشته شوند. هر چند، پیوندهای هیدروژنی موجود در مارپیچ دورشته تنها جایگزین پیوندهای دارای انرژی مشابه بین نوکلئوبازها و آب در پلی-نوکلئوتیدهای تک-رشته می‌گردند. لذا ایجاد پیوند هیدروژنی چسبی برای حفظ ساختمان-های مارپیچی-دورشته نمی‌باشند. با این وجود، برخلاف نیروهای تراکمی، پیوندهای هیدروژنی شدیداً جهت‌دار بوده و به تمایز بین جفت بازهای صحیح و غلط کمک می‌کنند. به دلیل جهت‌داری، پیوندهای هیدروژنی تمایل دارند تا نوکلئوبازها را طوری جهت‌دهی کنند که تراکم‌پذیری مساعد گردد. بنابراین، همکاری پیوندهای هیدروژنی به‌طور غیرمستقیم برای تثبیت مارپیچ دورشته مهم است.

اهمیت نسبی تعاملات تراکمی، در مقابل ایجاد پیوندهای هیدروژنی، در تثبیت مارپیچ دورشته قبلاً مورد توجه قرار نداشت. آزمایش‌هایی که با استفاده از معرف‌هایی انجام می‌شوند که پایداری مارپیچ دورشته را کاهش می‌دهند (عوامل دناتوره‌کننده) اهمیت نسبتاً بیشتر تعاملات بازی را نشان می‌دهند (جدول ۲-۲). این نتایج نشان می‌دهند که اثر ناپایدار-کننده یک معرف با توانایی آن در شکستن پیوندهای هیدروژنی ارتباطی ندارد، ولی براساس حلالیت بازهای آزاد در معرف قابل اندازه‌گیری است. هر چه معرف حلال بهتری برای بازها باشد، نیروی پیشبرنده ایجاد تراکم کاهش یافته و مارپیچ دورشته ناپایدار می‌گردد.

نیروهای الکترواستاتیک نیز بر روی پایداری و کونفورماسیون مارپیچ دورشته تأثیر دارند. گروه‌های فسفودی‌استری در pH فیزیولوژیک یونیزه هستند؛ لذا بخش خارجی

جدول ۲-۲ • اثرات معرف‌های مختلف بر روی پایداری مارپیچ دوتایی[1]

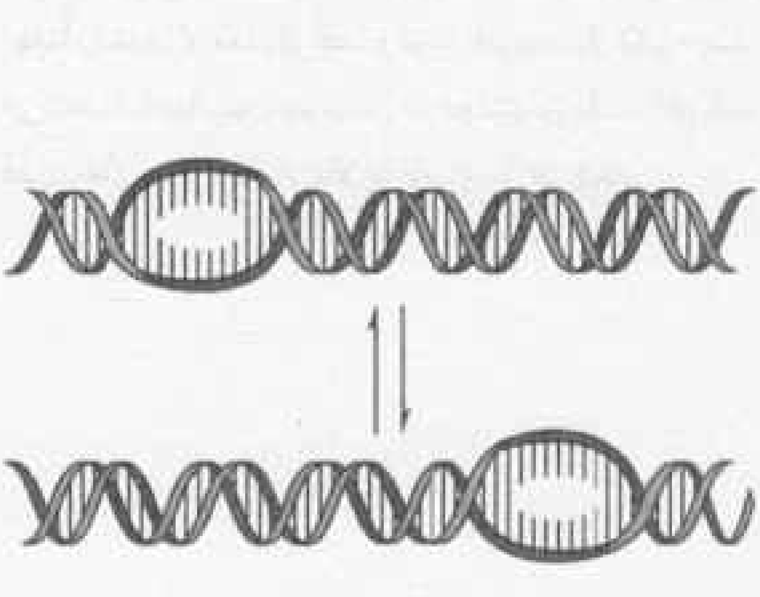
معرف	حلالیت آدنینی $\times 10^{-3}$ (در معرف یک مولار)	مولاریتی که سبب ۵۰٪ دناتوراسیون می‌شود
اتیل اوره	۲۲٫۵	۰٫۶۰
پروپیونامید	۲۲٫۵	۰٫۶۲
اتانل	۱۷٫۷	۱٫۲
اوره	۱۷٫۷	۱٫۰
متانل	۱۵٫۹	۳٫۵
فورماید	۱۵٫۴	۱٫۹

[1] اثر ناپایدارکننده معرف‌های فهرست‌شده بر روی مارپیچ دوتایی مستقل از توانایی این معرف‌ها در شکستن پیوندهای هیدروژنی است. در عوض، اثر ناپایدارکننده توسط حلالیت آدنین تعیین می‌شود. در صورت بررسی حلالیت سایر بازها، نتایج مشابهی را می‌توان انتظار داشت.

مارپیچ دورشته دو بار منفی در هر جفت باز دارد. دافعه الکترواستاتیکی بین‌رشته‌ای حاصل از فسفات‌های دارای بار منفی، سبب ناپایداری و جدایی رشته‌های مکمل می‌شوند. در آب مقطر، رشته‌های DNA در درجه حرارت اتاق جدا می‌شوند. هر چند، کاتیون‌هایی نظیر Mg^{2+}، $spermine^{4+}$ (یک تترآمین)، و زنجیرهای جانبی مربوط به اسیدهای آمینه بازی کامل موجود در پروتئین‌ها می‌توانند این گروه‌های فسفات را پوشانده و سبب کاهش نیروهای دافعه شوند.

دناتوراسیون و رناتوراسیون

مارپیچ دو رشته طی تقریباً هر فرآیند بیولوژیکی مهمی که در آن DNA شرکت می‌کند، شامل همانندسازی، رونویسی، ترمیم و نوترکیبی DNA، از بین می‌رود. نیروهایی که دو رشته را در کنار یکدیگر قرار می‌دهند، برای پایداری کافی هستند، ولی آنقدر هم ضعیف هستند که امکان جدایی آسان رشته‌ها فراهم باشد. مارپیچ دورشته نسبت به رشته‌های تک به میزان حدود ۴ kJ/mol (۱ kcal/mol) به ازاء هر جفت باز پایدارتر می‌باشد، به طوری‌که یک آشفتگی نسبتاً کوچک می‌تواند سبب جدایی موضعی قطعه کوتاهی از مارپیچ دورشته شود. این جفت بازها می‌توانند دوباره تشکیل شوند و انرژی آزادی را رها کنند که می‌تواند سبب جدایی جفت بازهای مجاور گردد. به این طریق، آشفتگی‌های کوچک مارپیچ دورشته می‌توانند در طول مارپیچ حرکت کنند (شکل ۱۶-۲). بنابراین، در هر حرکت خاص، اکثریت بازها به صورت دارای پیوند هیدروژنی باقی می‌مانند، ولی تمامی بازها می‌توانند به‌طور گذرا از حالت تک-رشته عبور کنند. توانایی مارپیچ دورشته DNA در نفس‌کشیدن یکی از مقدمات ضروری برای عملکرد بیولوژیکی آن می‌باشد.



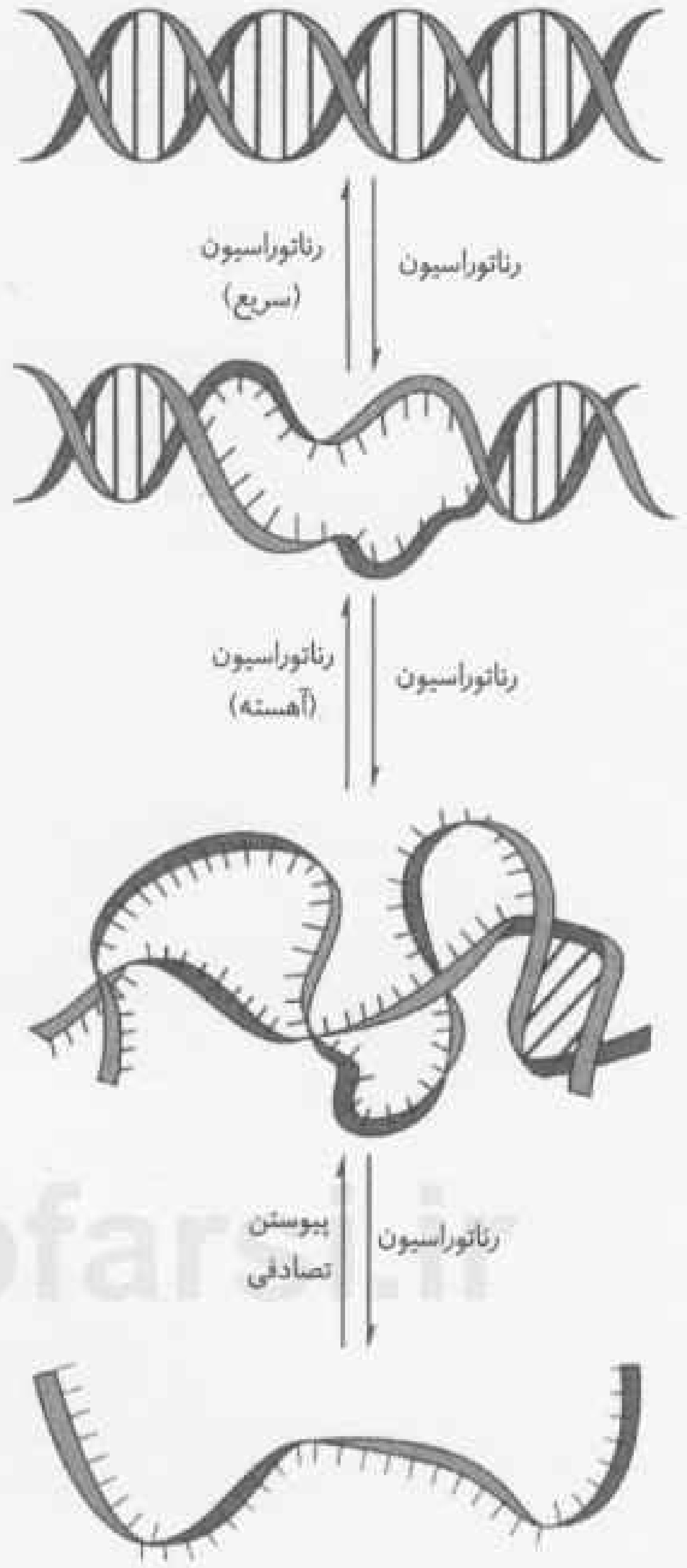
شکل ۱۶-۲ **حرکت حباب در طول DNA مارپیچی-دورشته.** DNA حاوی بخش‌های کوتاه بازشده از رشته‌های DNA است که می‌توانند در طول مارپیچ «حرکت» کنند.

جداسازی رشته‌ها را می‌توان با افزایش درجه حرارت محلول مورد مطالعه قرار داد. در

درجه حرارت‌های نسبتاً پایین، چند جفت باز از بین می‌روند و تولید یک یا چند حباب باز می‌شود که در آنها رشته‌ها از یکدیگر جدا شده‌اند (شکل ۱۷-۲). این حباب‌ها در ابتدا بخش‌هایی را تولید می‌کنند که نسبت‌های تقریباً بالای جفت‌های آدنین-تیمین را دارند، زیرا این جفت‌ها انرژی تراکمی کمتری دارند. با افزایش درجه حرارت، اندازه حباب‌ها بزرگتر شده و حرکت حرارتی پلی‌نوکلوتیدها نهایتاً بر نیروهای تثبیت‌کننده مارپیچ دورشته غلبه می‌کنند. در درجه حرارت‌های حتی بالاتر، رشته‌ها جدا شده و یک کونفورماسیون تصادفی-فنری [1] را به‌دست می‌آورند. این فرایند به شکل مناسبی براساس تغییر مارپیچ به فنر تشریح می‌شود، ولی معمولاً تحت عنوان **دناتوراسیون** [2] یا **ذوب‌شدن** [3] مورد اشاره قرار می‌گیرد.

دناتوراسیون همراه با چندین تغییر فیزیکی در محلول حاوی DNA، شامل افزایش در چگالی شناوری [4]، کاهش در چسبندگی [5]، تغییر توانایی چرخش نور پولاریزه، و تغییراتی در جذب نور UV می‌باشد. در اغلب موارد از تغییر اخیر به‌طور تجربی برای پیگیری فرایند دناتوراسیون استفاده می‌شود (شکل ۱۸-۲). به دلیل جذب قوی حاصل از بازهای پورینی و پیریمیدینی، DNA در ناحیه UV جذب قوی با حداکثر جذب در نزدیکی ۲۶۰ nm دارد. هرچند، جذب هر باز به‌واسطه تعاملات موجود در بین بازهای متراکم‌شده ازدست می‌رود. جذب تام ممکن است در مقایسه با حالت متراکم‌نشده، تا ۴۰٪ کاهش یابد. این کاهش در ضریب خاموشی بازهای تجمع‌یافته را **کم‌رنگی** [6] گویند. با از بین رفتن ساختمان منظم مارپیچ دو رشته در اثر افزایش درجه حرارت، تعاملات تراکم بازی بتدریج کاهش می‌یابند. لذا یک پلی‌نوکلئوتید کاملاً نامنظم‌شده به جذبی می‌رسد که قابل قیاس با جذب‌های مربوط به اجزاء پورینی و پیریمیدینی آن است.

اندازه‌گیری جذب یک کمپلکس DNA در ۲۶۰ nm در هنگام افزایش آهسته درجه حرارت راهی برای مشاهده دناتوراسیون فراهم می‌سازد. در یک آزمایش دناتوراسیون حرارتی که با استفاده از اسپکتروسکوپی جذبی زیر نظر گرفته شده است، جذب پلی‌نوکلئوتیدی معمولاً در ابتدا بسیار کم تغییر می‌کند و سپس سریعاً به یک میزان حداکثر می‌رسد. قبل از افزایش، DNA از نوع دو رشته است. در قسمت افزایش یابنده این منحنی، تعداد روبه افزایشی از جفت بازها جدا می‌شوند. جداسازی کامل رشته در درجه حرارت‌هایی رخ می‌دهد که با بخش صفحه‌ای بالای منحنی در ارتباط است. درجه حرارت میانی این تغییر، تحت عنوان درجه حرارت ذوب (T_m) براساس محتوای بازی DNA تحت شرایط استاندارد غلظت و قدرت یونی مشخص می‌شود. هرچه محتوای گوانین-سیتوزین بیشتر باشد، درجه حرارت انتقال بین مارپیچ دو-رشته و رشته‌های مجزا بیشتر خواهد بود. این تفاوت در مقادیر T_m به دلیل افزایش پایداری جفت‌های گوانین-پورین می‌باشد که از تعاملات مساعدتر ایجاد تعاملات تراکمی حاصل می‌شود.



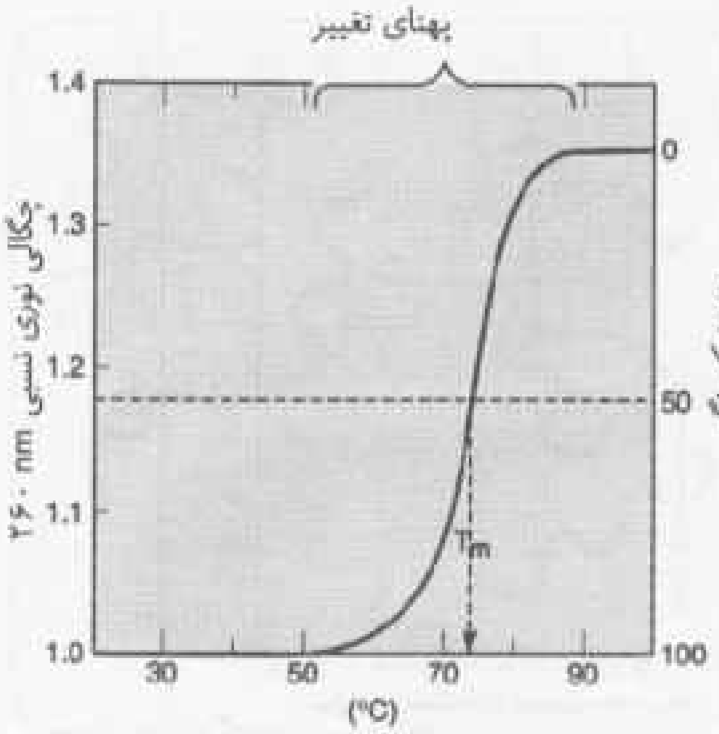
شکل ۱۷-۲ دناتوراسیون DNA. در درجه حرارت‌های بالا، ساختمان دو-رشته DNA به‌طور کامل از بین رفته و نهایتاً رشته‌ها از یکدیگر جدا و تولید فنرهای باز تک-رشته می‌کنند. دناتوراسیون همچنین در دو انتهای دامنه pH یا در قدرت‌های یونی بسیار بالا یا پایین رخ می‌دهد.

1. Random-coil
2. Denaturation
3. Melting
4. Buoyant density
5. Viscosity
6. Hypochromicity

DNA در pH بیش از ۱۱٫۳ دناتوره می‌شود، زیرا گروه‌های N − H موجود بر روی بازها دپروتونه شده و مانع از شرکت آنها در ایجاد پیوند هیدروژنی می‌شود. اغلب از دناتوراسیون قلیایی برای جلوگیری از آسیب DNA استفاده می‌شود که در درجه حرارت بالا یا pH پایین رخ می‌دهد. به دلیل افزایش دافعه بین‌رشته‌ای حاصل از گروه‌های دارای بار منفی و عوامل دناتوره‌کننده مختلف (ترکیباتی که می‌توانند به شکل مؤثری پیوند هیدروژنی با بازها برقرار کنند، در حالی‌که تعاملات آبگریز ایجادکننده تراکم را از بین می‌برند)، دناتوراسیون را همچنین می‌توان در قدرت‌های پایین یونی القاء نمود. با ایجاد تغییراتی در غلظت یک دناتوره‌کننده افزودنی نظیر اوره، یک منحنی دناتوراسیون کامل مشابه موردی که در شکل ۱۸-۲ نشان داده شده است، در درجه حرارت‌های ثابت نسبتاً پایین مشاهده می‌شود.

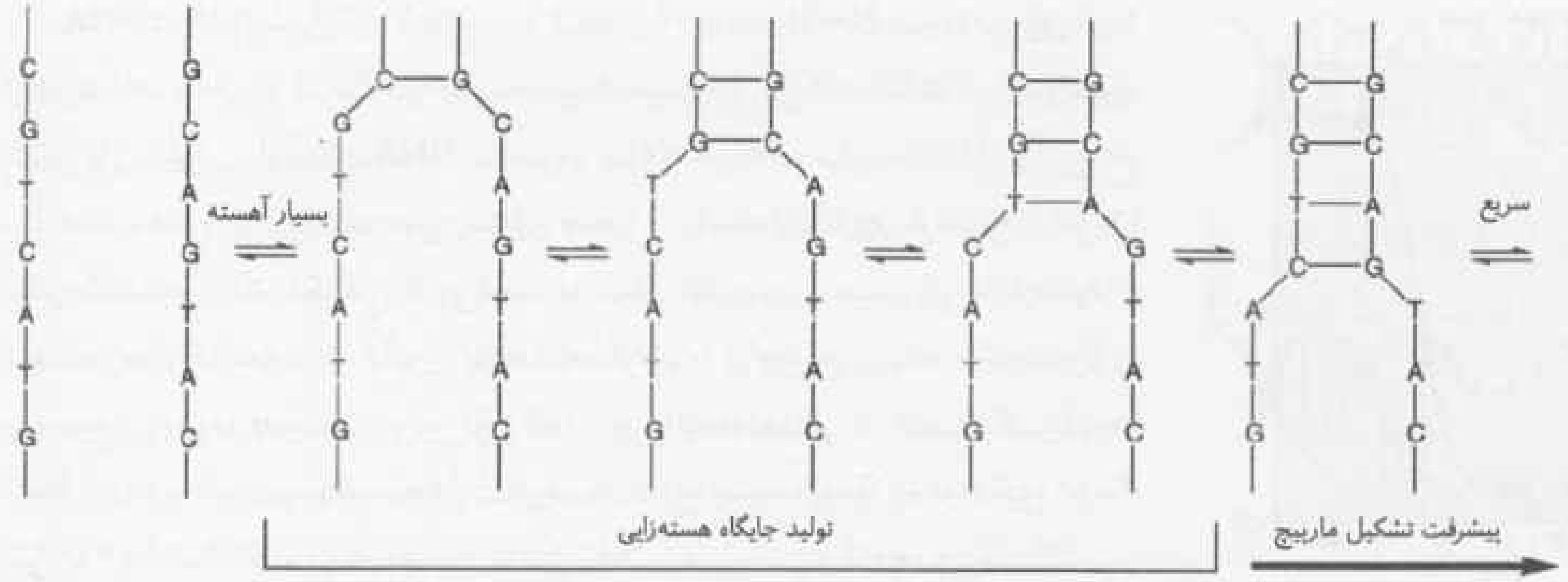
رشته‌های DNA مکمل که با دناتوراسیون جدا شده‌اند، در شرایط مناسب می‌توانند یک مارپیچ دورشته را دوباره به‌وجود آورند. این تغییر را **رناتوراسیون**[1] یا **سردشدن**[2] گویند. در صورتی که دناتوراسیون کامل نباشد و چند نوکلئوباز همچنان پیوند هیدروژنی بین دو رشته را برقرار کرده باشند، تغییر مارپیچ به فنر سریعاً قابل برگشت می‌باشد. حتی بعد از جداشدن کامل رشته‌های مکمل از یکدیگر، سردشدن امکانپذیر است. تحت این شرایط فرایند رناتوراسیون بستگی به رشته‌های DNA دارد که به‌طریقی به یکدیگر می‌رسند که می‌تواند منجر به تولید مجدد ساختمان ابتدایی گردد. تعجب‌آور نیست که این یک فرایند آهسته وابسته به غلظت است. وقتی تغییر شروع شد، برخی پیوندهای هیدروژنی بین قطعات کوتاه امتدادیافته پلی‌نوکلئوتیدهایی تشکیل می‌شوند که ممکن است در ساختمان بومی ابتدایی دور از یکدیگر باشد. این ساختمان‌های جفت‌ - بازی تصادفی عمر کوتاهی دارند، زیرا بازهایی که این قطعات مکمل کوتاه را احاطه کرده‌اند، قادر به ایجاد جفت باز نبوده و بنابراین نمی‌توانند یک ساختمان پایدار با پیوندهای هیدروژنی کامل را به‌وجود آورند. وقتی نوکلئوبازهای درست به‌طور شانسی شروع به جفت‌شدن می‌کنند، مارپیچ دورشته سریعاً دوباره در کل ملکول DNA تشکیل می‌شود.

شروع ناگهانی دناتوراسیون و رناتوراسیون ماهیت همه یا هیچ تغییرات مارپیچ به فنر یا فنر به مارپیچ را آشکار می‌کند. فرایند رناتوراسیون نیاز به تولید یک ناحیه کوتاه مارپیچ - دورشته برای شروع تولید مارپیچ دورشته دارد (شکل ۱۹-۲). این موضوع با تشکیل یک جفت باز شروع می‌شود که نسبتاً ناپایدار است. هر چند، تولید یک جفت باز دوم مجاور تسریع می‌شود، زیرا حالا این فرایند از نظر آنتروپی کمتر نامساعد است. وقتی یک جفت باز جدید شروع به تولید یک ساختمان متراکم می‌کند، تشکیل جفت بازهای بعدی بیشتر تسهیل می‌گردد. نوکلئوتیدهای جفت‌نشده هر رشته بر روی مارپیچ در حال رشد شروع به ایجاد تراکم کرده و در موقعیت مطلوب برای ایجاد جفت باز قرار می‌گیرند. بعد از تولید یک مارپیچ دورشته با چهار تا پنج جفت باز، یک شکل مارپیچ دورشته پایدار تشکیل



شکل ۱۸-۲ نمودار درجه حرارت - چگالی نوری برای DNA. وقتی DNA حرارت داده می‌شود، جذب در ۲۶۰ nm با افزایش درجه حرارت زیاد می‌شود. نموداری که در آن جذب در برابر درجه حرارت رسم شده است را نمودار ذوب‌شدن گویند. چگالی نوری نسبی نسبت جذب در هر درجه حرارت به این چگالی در درجه حرارت پایین می‌باشد. درجه حرارتی که در آن نیمی از چگالی نوری حداکثر حاصل شده است را درجه حرارت میانی T_m گویند.

1. Renaturation 2. Annealing



شکل ۱۹-۲ همکاری (اثر تعاونی) رناتوراسیون/دناتوراسیون مارپیچ‌های دوتایی DNA. طی رناتوراسیون، تولید اولین جفت باز صحیح بسیار آهسته است. سردشدن جفت‌های مجاور، به‌خصوص بعد از تشکیل یک جایگاه هسته‌زایی ۳ یا ۵ جفت‌بازی، تسریع می‌شود. دناتوراسیون از یک دوره مشابه پیروی می‌کند، ولی ترتیب مراحل برعکس می‌باشد.

می‌شود و بقیه کمپلکس سریعاً و به‌طور خودبه‌خودی «زیپ می‌شود». بعد از تشکیل جفت باز ابتدایی، متراکم‌شدن و ایجاد جفت باز حوادث مستقلی هستند، ولی تحت تأثیر جفت‌های مجاور قرار می‌گیرند. چنین فرآیندی را **تعاون (همکاری)**[1] گویند. وجود یک مارپیچ دورشته کوتاه به عنوان یک جایگاه هسته‌سازی[2] برای سردشدن از طریق تسهیل تشکیل جفت بازهای بعدی عمل می‌کند. دناتوراسیون همراه فرآیند عکس است: یک حباب به‌عنوان جایگاه ابتدایی برای تراکم‌زدایی[3] نوکلئوبازها و بازشدن سریع زیپ مارپیچ عمل می‌کند.

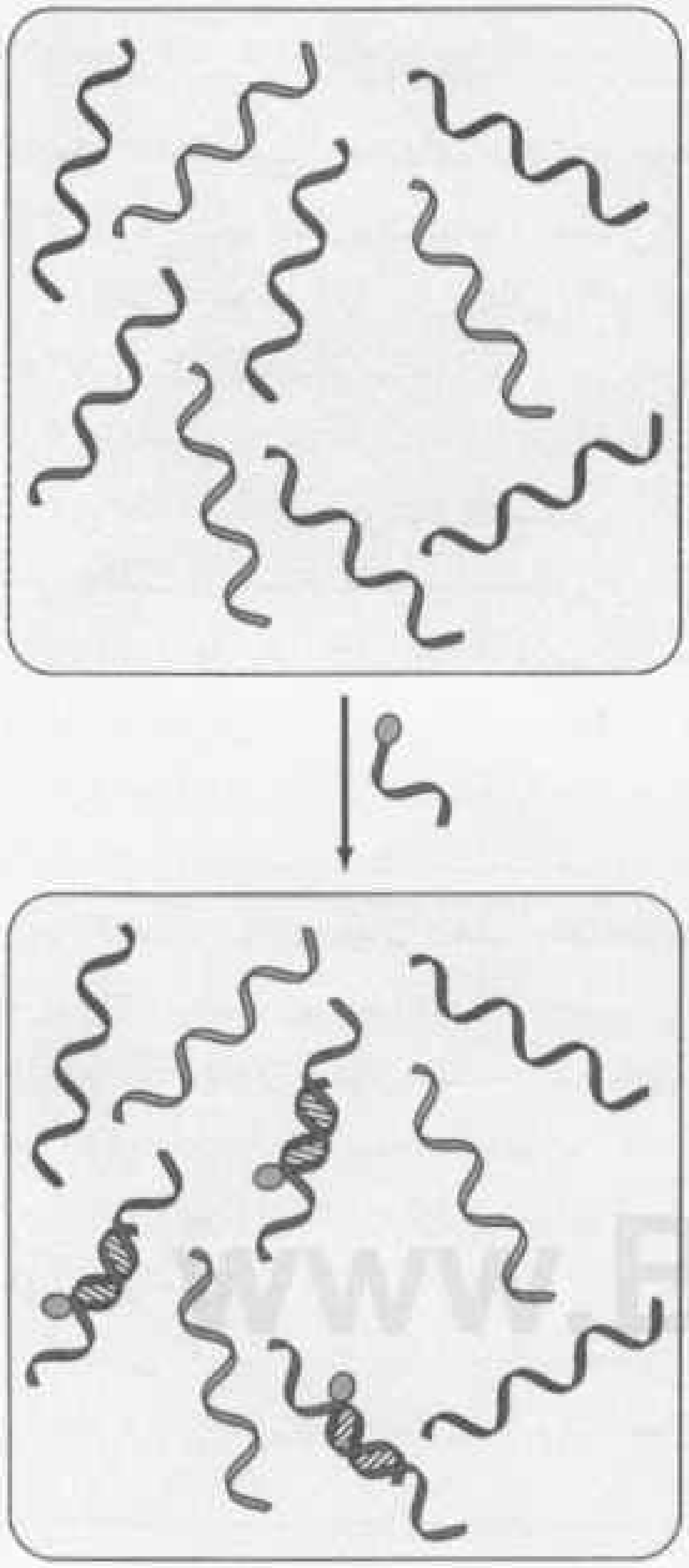
هیبریدیزاسیون

تکنیکی براساس پیوستن رشته‌های پلی‌نوکلئوتیدی مکمل به یکدیگر، تحت عنوان **هیبرید-یزاسیون**، برای جستجو و تعیین مقدار توالی‌های اختصاصی اسید نوکلئیک هدف ابداع شده است. این تکنیک‌ها ابزارهای پایه مهمی در بیولوژی ملکولی معاصر هستند و برای تعیین (۱) وجود یک توالی خاص در DNA یک ارگانیسم خاص، (۲) یک ارتباط ژنتیکی یا تکاملی بین موجودات مختلف، (۳) تعداد ژن‌های رونویسی‌شده در mRNA خاص، و (۴) موقعیت هر توالی DNA خاص، مورد استفاده قرار می‌گیرد. هیبریدیزاسیون وابسته به سردشدن یک پلی‌نوکلئوتید مکمل، تحت عنوان پروب، می‌باشد که به شکل مناسبی برای جستجوی راحت مارپیچ دورشته هیبرید، دنباله‌دار شده است.

در هر آزمایش معمولی، DNA یا RNA مورد آزمایش برای هیبریدیزاسیون، دناتوره شده و با اتصال به یک ماتریکس غیرمحلول مناسب، ثابت می‌گردد. سپس اجازه داده

1. Cooperative 2. Nucleation site 3. Unstacking

می‌شود تا پروب‌های DNA نشاندار با توالی‌های مکمل متصل به ماتریکس جفت شوند (شکل ۲۰-۲). پروب‌ها اولیگونوکلئوتیدهای تک-رشته کوتاه RNA یا DNA هستند که مکمل توالی‌های اختصاصی مورد نظر می‌باشند. تحت شرایط مناسب، پروب‌ها تنها با قطعه مورد نظر تعامل می‌کنند که نشان می‌دهند که آیا این قطعه در یک نمونه خاص DNA وجود دارد یا خیر. ملکول‌های پروب معمولاً بیش از ۲۰ نوکلئوتید طول دارند. نشانگرهای مناسب شامل عناصر رادیواکتیو، کروموفورهای فلورسنت، و بیوتین هستند. از آنجایی که کمپلکس مارپیچی-دورشته حاوی پروب هیبریدشده معمولاً متصل به یک ماتریکس نامحلول می‌باشد، پروب‌های هیبریدنشده را می‌توان با شستشو برداشت نمود. جستجوی نشانگرهای اتصال‌یافته امکان تعیین مقدار مستقیم توالی مورد نظر را فراهم می‌سازد. با تعیین میزان حداکثر DNAای که می‌تواند هیبرید شود، امکان تعیین میزان هُمولوژی بین ملکول‌های DNA گونه‌های مختلف وجود دارد، زیرا توالی‌های بازی موجود در هر موجود زنده بی‌همتا می‌باشد. هُمولوژی‌های مشاهده شده به‌عنوان معیارهایی از ارتباط تکاملی عمل می‌کنند و به‌خصوص برای تعیین فیلوژنی‌ها در پروکاریوت‌ها مفید هستند. مطالعات هیبریدیزاسیون بین DNA و RNA اطلاعات بسیار مفیدی را در خصوص نقش بیولوژیکی DNA، به‌خصوص مکانیسم رونویسی، فراهم کرده‌اند. همان‌طور که در ارتباط بالینی ۲-۲ شرح داده شده است، مجموعه‌هایی از پروب‌ها برای تشخیص قطعی و سریع ناهنجاری‌های ژنتیکی، بیماری‌های عفونی و سرطان مفید هستند.



شکل ۲۰-۲ **نمایش عمومی آزمایش‌های هیبریدیزاسیون.** مخلوطی از ملکول‌های DNA دناتوره در معرض یک پروب DNA نشاندار قرار داده می‌شوند. این پروب می‌تواند با ملکول‌های DNAای هیبرید شود که توالی‌های مکمل را دارند. جستجوی کمپلکس‌های مارپیچی-دورشته امکان جستجو و تعیین مقدار DNAای را فراهم می‌سازد که حاوی توالی موردنظر است. کاربردهای اختصاصی اغلب شامل مراحلی برای جداسازی و تثبیت ملکول‌های DNA مختلف موجود در مخلوط است که قرار است پروب شوند.

کونفورماسیون‌های DNA دورشته-مارپیچی

مطالعات انکسار اشعه-X ابتدایی نشان دادند که بیش از یک کونفورماسیون برای DNA وجود دارد (شکل ۲۱-۲). یکی از این کونفورماسیون‌ها، یعنی A-DNA، در شرایط رطوبت[1] پایین و غلظت بالا نمک یافت شد. افزودن حلال‌های آلی نظیر اتانل سبب کاهش رطوبت این محلول‌های آبی می‌شود. شکل دوم متفاوت، یعنی B-DNA، تحت شرایط رطوبت بالا و غلظت پایین نمک نمایان شد و اساس ساختمان واتسون-کریک بود. یازده کونفورماسیون متفاوت DNA دو-رشته مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. این کونفورماسیون‌ها از نظر موقعیت بازها نسبت به مارپیچ و نسبت به یکدیگر و از نظر سایر پارامترهای هندسی مارپیچ دو رشته متفاوت هستند. یکی از این اشکال، یعنی Z-DNA، یک مارپیچ چپ‌گردان را به‌جای شکل راست‌گردان معمول دارد.

چندشکلی ساختمانی DNA دو-رشته بستگی به ترکیب بازی و شرایط فیزیکی دارد. ساختمان موضعی DNA به اندازه کافی انعطاف‌پذیر می‌باشد که اجازه تغییرات کونفورماسیونی را بدهد تا تراکم‌پذیری به حداکثر برسد، در حالی‌که تعاملات فضایی نامساعد به میزان حداقل کاهش یابد. ارجحیت‌های تراکم‌پذیری بازها می‌توانند سبب مساعدت یک

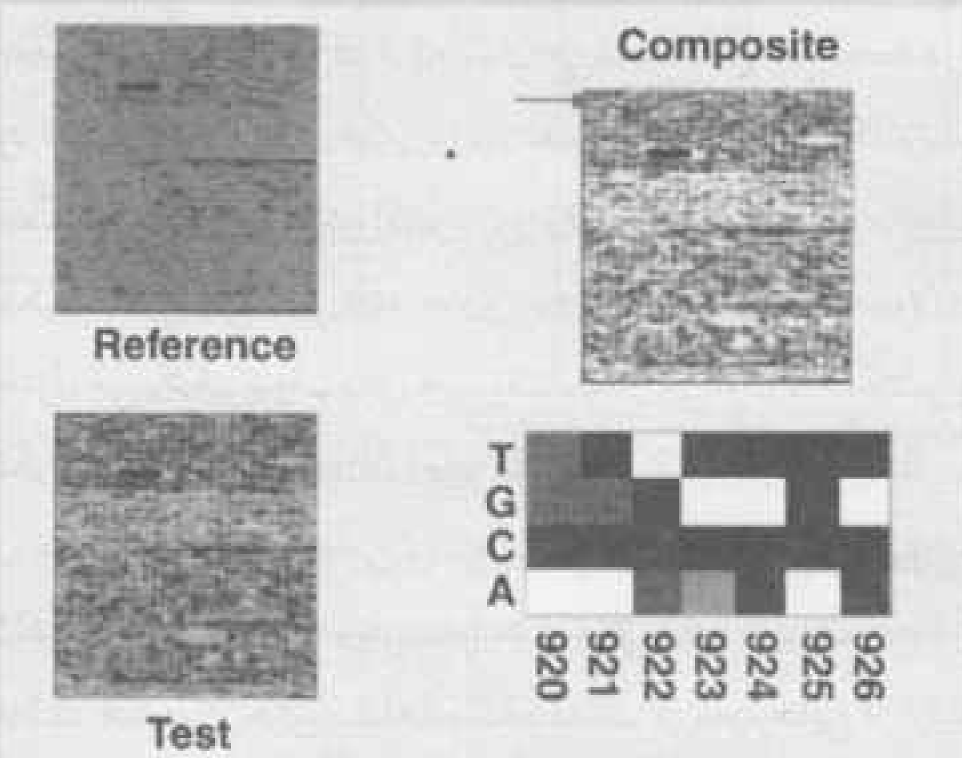
1. Humidity

ارتباط بالینی ۲-۲

کاربرد تشخیصی آرایه‌های DNA در پزشکی و ژنتیک

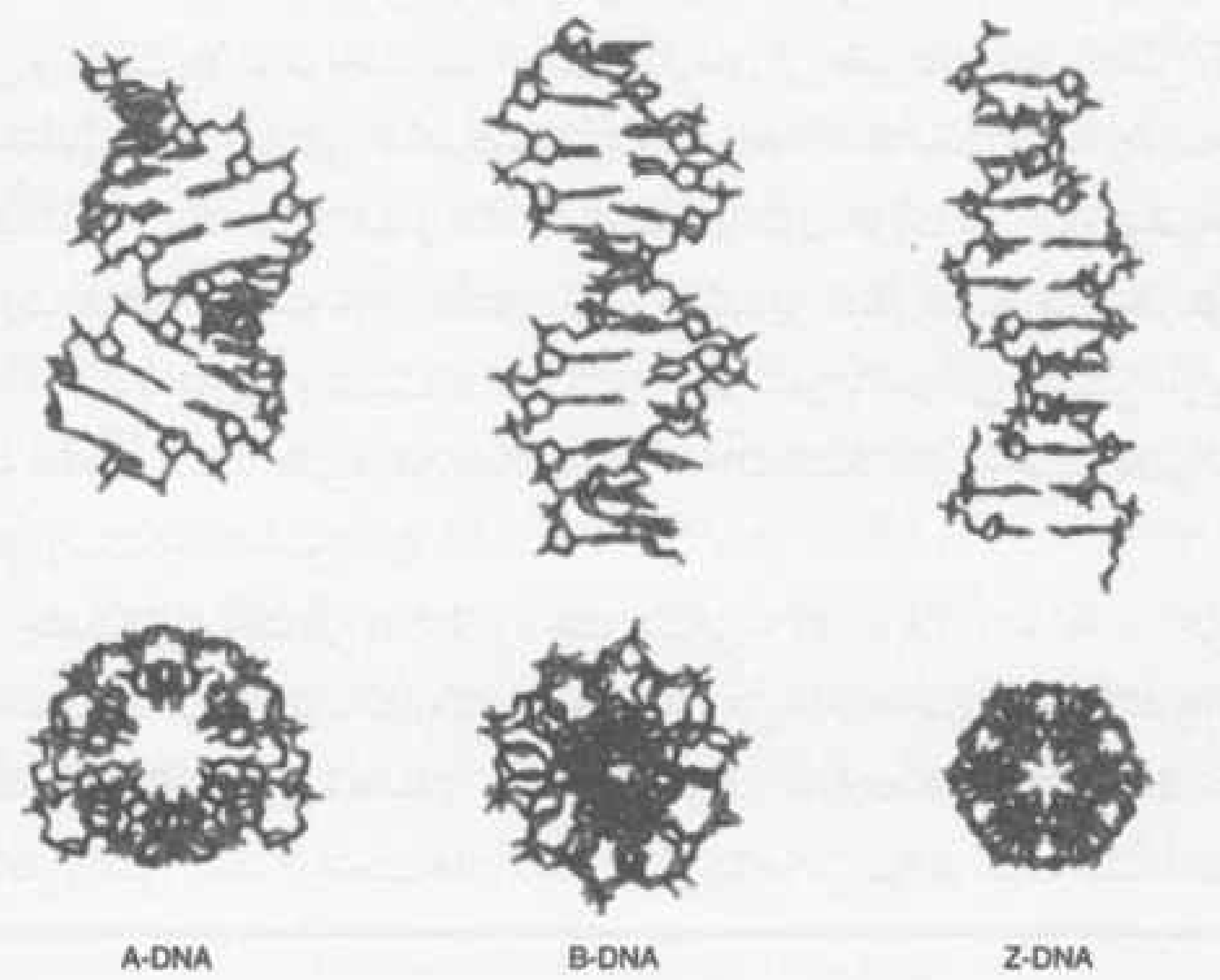
با تکمیل طرح ژنوم انسانی، سریعاً سیل عظیمی از اطلاعات در دسترس قرار گرفتند. کاربرد این دانش در پزشکی نیاز به ابداع تکنیک‌های جدید برای پایش بیان ژن و آنالیز سریع ژن‌ها از نظر وجود جهش دارد. آرایه‌های اولیگونوکلئوتیدی متشکل از تعدادی پروب اولیگونوکلئوتیدی اختصاصی - ژن می‌باشند که بر روی محل‌های اختصاصی بر روی یک ماتریکس جامد (خرده[1]) ثابت شده‌اند. اینها می‌توانند شامل هزاران ملکول پروب بی‌همتا، هر کدام در داخل یک آدرس ثابت فضایی، باشند. سپس خرده‌های ژنی را می‌توان در معرض اسیدهای نوکلئیک (DNA یا RNA) هدف نشاندار مشتق از سلول‌های یک موجود زنده قرار داد. هیبریدیزاسیون این اهداف با توالی‌های پروب مکمل، امکان تثبیت نشانه در محل‌های اختصاصی بر روی خرده را فراهم می‌سازد. وجود توالی‌های اختصاصی را می‌توان تعیین نمود و میزان هدف نشاندار هیبریدشده در یک محل را می‌توان تعیین مقدار نمود.

چنین تکنیک‌هایی ممکن است در غربالگری سریع DNA ژنومی از نظر جهش‌های مرتبط با بیماری، منتهی به تشخیص شوند. برای مثال، آرایه‌های DNA تراکم بالا با هزاران پروب اولیگونوکلئوتیدی در جستجوی جهش‌های منتهی به آتاکسی تلانژکتازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که یک بیماری مغلوب است و با ناهنجاری عصبی، عفونت تنفسی مکرر و اتساع عروق خونی در پوست و چشم مشخص می‌شود.



مطالعات مشابهی وجود جهش‌هایی را در ژن BRCA مربوط به سرطان ارثی پستان و تخمدان مورد بررسی قرار داده‌اند. آزمون‌های مشابهی را می‌توان برای تعیین هویت صحیح عوامل بیماریزا در یک نمونه بالینی مورد استفاده قرار داد. توانایی در تعیین مقدار میزان ملکول‌های mRNA در سلول‌های مختلف، امکان تعیین پروفایل بیان ژن را فراهم می‌سازد. این ممکن است منتهی به تکنیکی برای ارزیابی بیماری نظیر سرطان و انتخاب درمان‌های فردی‌شده گردد.

1. Chip



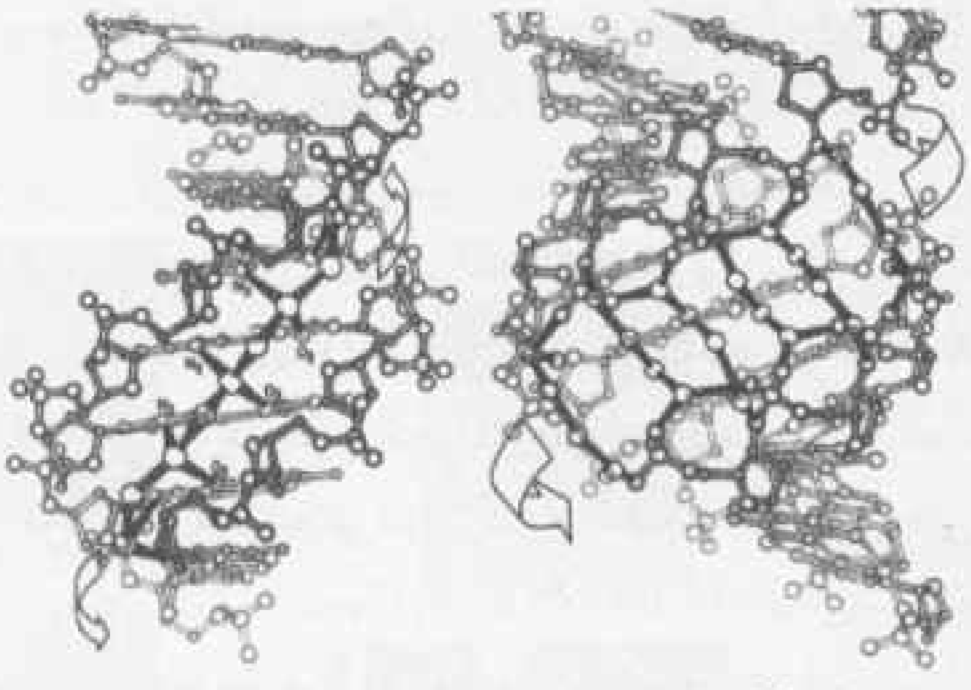
شکل ۲۱-۲ هندسه‌های مختلف DNA مارپیچی-دوتایی. برحسب شرایط و توالی بازی، مارپیچ دورشته می‌تواند هندسه‌های متفاوت متنوعی را اتخاذ کند. سه خانواده اصلی، A، B و Z کونفورماسیون‌های DNA وجود دارند. اشکال راست‌گردان DNA- B و A-DNA، از نظر چروکیدگی قندی متفاوتند که این منجر به تفاوت در ساختمان مارپیچی آنها می‌شود. شکل A در مقایسه با شکل B، از نوع کم‌تاب است که سبب می‌شود که مارپیچ حاصل کوتاه‌تر و پهن‌تر باشد. ساختمان Z-DNA یک مارپیچ چپ-گردان با یک اسکلت زیگزاگی است. چروکیدگی‌های قندی و کونفورماسیون‌های گلیکوزیدی از یک نوکلئوتید به نوکلئوتید بعدی جابه‌جا شده که نتیجه آن یک واژگونی موضعی در جهت زنجیر است.

کونفورماسیون نسبت به کونفوماسیون‌های دیگر شوند. برای مثال، گوانین‌های پشت‌سرهم موجود در یک رشته، کونفورماسیون‌های A-DNA- مانند را مساعدت می‌کنند. شرایط حلال نیز نقش کلیدی در تعیین کونفورماسیون مساعد دارد. ملکول‌های آب با مارپیچ‌های دورشته دارای کونفورماسیون‌های مختلف به‌شکل متفاوتی تعامل می‌کنند. برای مثال، گروه‌های فسفات موجود در B-DNA بیشتر از انواع موجود در A-DNA در دسترس ملکول‌های آب قرار دارند. همچنین، گروه‌های قطبی موجود در بازها، در کونفورماسیون B-DNA به شکل بهتری هیدراته می‌شوند. در حقیقت، در توالی‌های غنی از AT، یک دسته منظم ملکول‌های آب شیار کوچک باریک B-DNA را اشغال می‌کنند (شکل a۲۲-۲). با کاهش میزان رطوبت، ملکول‌های آب موجود بیشتر گروه‌های فسفات شدیداً باردار را نسبت به بازها حل می‌کنند. باریک‌شدن شیار بزرگ به ملکول‌های آب این امکان را می‌دهد تا بین فسفات‌ها پل بزنند (شکل b۲۲-۲) و بنابراین سبب تثبیت کونفورماسیون A-DNA گردند.

کونفورماسیون‌های مختلف DNA را می‌توان در سه خانواده گروه‌بندی کرد :A-DNA، B-DNA، و Z-DNA. پارامترهای مربوط به این کونفورماسیون‌ها که در جدول ۳-۲ خلاصه شده‌اند، با استفاده از روش‌های انکسار اشعه-X تعیین شده‌اند. لازم به تأکید است که معتقدند ساختمان کلی متوسط DNA در موجودات زنده از نوع B-DNA- مانند است. به‌خصوص کونفورماسیون B، برخلاف اشکال A و Z، شدیداً انعطاف‌پذیر می‌باشد. در B-DNA بومی، امکان دارد تنوع موضعی قابل توجهی در کونفورماسیون نوکلئوتیدهای مجزا رخ دهد. این تغییرات ممکن است در تنظیم بیان ژن نقش داشته باشند، زیرا بر وسعت اتصال انواع مختلف پروتئین‌های تنظیمی به DNA تأثیر می‌گذارند.

جفت بازها در کونفورماسیون‌های DNA در خانواده B تقریباً عمود بر محور مارپیچی هستند که از میان جفت بازها عبور می‌کند. شیارهای بزرگ و کوچک تقریباً عمق یکسانی دارند و شیار کوچک نسبتاً باریک می‌باشد. مارپیچ بلند و نازک است و در هر دور مارپیچی تقریباً ۱۰ جفت باز دارد. میزان افزایش طول برابر ۳٫۴Å، تقریباً برابر با ضخامت بازها، است. برعکس، ساختمان A-DNA کوتاه‌تر و ضخیم‌تر است. در این مارپیچ ۱۱ جفت باز در هر دور مارپیچ وجود دارد که همراه با افزایش طول عمودی ۲٫۵۶Å به ازاء هر ریشه است. برای تطابق با ضخامت بازها، این جفت باز ۲۰° از صفحه عمود بر محور مارپیچ خم می‌شود. محور مارپیچ به سمت شیار بزرگ جفت بازها جابه‌جا می‌شود. نتیجه یک شیار بزرگ بسیار عمیق و یک شیار کوچک کم عمق و تشکیل سوراخی به قطر حدود ۳Å می‌باشد که در میان بخش مرکزی مارپیچ می‌پیچد. رطوبت پایین ساختمان A-DNA را مساعدت می‌کند که سطح آبگریز بیشتری را نسبت به ساختمان B-DNA در معرض حلال قرار می‌دهد.

Z-DNA یک کونفورماسیون مارپیچی - دوتایی چپ‌گردان کاملاً متفاوت برای DNA

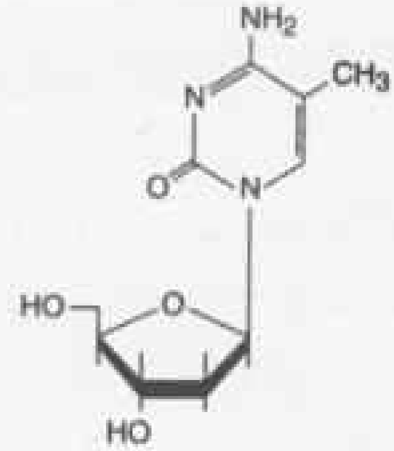


شکل ۲۲-۲ هیدراتاسیون شیارهای DNA. (a) یک ردیف سازمان‌یافته هیدراتاسیون، شیار کوچک B-DNA را پر می‌کند. (b) فسفات‌هایی که شیار بزرگ را پوشانده‌اند توسط شبکه‌ای از ملکول‌های آب در A-DNA پوشانده می‌شوند.

جدول ۳-۲ خصوصیات ساختمانی A-، B- و Z-DNA

خصوصیت	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
چرخش مارپیچ	راست‌گردان	راست‌گردان	چپ‌گردان
جفت باز در هر دور (کریستال)	۱۰٫۷	۹٫۷	۱۲
جفت باز در هر دور (رشته)	۱۱	۱۰	–
جفت باز در هر دور (محلول)	–	۱۰٫۵	–
گام در هر دور مارپیچ	۲۴٫۶Å	۳۳٫۲Å	۴۵٫۶Å
نسبت‌ها	کوتاه و پهن	بلندتر و باریک‌تر	امتداد یافته و نازک
قطر تراکم‌پذیری مارپیچ	۲۵٫۵Å	۲۳٫۷Å	۱۸٫۴Å
خیز به ازاء هر جفت باز (کریستال)	۲٫۳Å	۳٫۳Å	۳٫۷Å
خیز به ازاء هر جفت باز (رشته)	۲٫۶Å	۳٫۴Å	–
محور مارپیچ	شیار بزرگ	از میان جفت بازها	شیار کوچک
کونفورماسیون حلقه قند (کریستال)	C3′ اَندو	متغیر	متناوب
کونفورماسیون حلقه قند (رشته)	C3′ اَندو	C2′ اَندو	–
کونفورماسیون پیوند گلیکوزیل	آنتی	آنتی	آنتی در C، سین در G

دورشته است. این کونفورماسیون در توالی‌های متناوب پورین‌ها و پیریمیدین‌ها، به‌خصوص $d(GC)n$، وجود دارد. انتخاب نام Z به این دلیل بوده است که اسکلت فسفودی‌استری یک آرایش زیگزاگی را در مقایسه با کونفورماسیون صاف مشخص A-DNA و B-DNA اتخاذ می‌کند. ساختمان Z-DNA بلندتر و به مراتب بسیار باریک‌تر از B-DNA است و در هر ۱۲ جفت باز یک دور راکامل می‌کند. شیار باریک بسیار عمیق است و حاوی محور مارپیچ می‌باشد. جفت بازها طوری در داخل شیار بزرگ جابه‌جا می‌شوند که دیگر یک



شکل ۲۳-۲ ساختمان ۵- متیل سیتیدین.

کانال مجزا وجود ندارد. این تغییرات سبب می‌شود تا نوکلئوبازهای متراکم‌شده در قسمت خارجی Z-DNA، به‌جای موقعیت‌های مرسوم خود در داخل مارپیچ دوتایی، قرار بگیرند.

شواهدی وجود دارند که مطرح می‌کنند Z-DNA بر روی بیان و تنظیم ژن تأثیر می‌گذارد. واضحاً قطعات کوچکی از DNA که حاوی پورین‌ها و پیریمیدین‌های یک در میان هستند، معمولاً در انتهای ۵′ ژن‌ها یافت می‌شوند که نواحی برای تنظیم فعالیت رونویسی هستند. همچنین، متیلاسیون ریشه‌های گوانین در موقعیت‌های C8 و N7 یا ریشه‌های سیتوزین در موقعیت C5 (شکل ۲۳-۲) سبب تثبیت شکل Z می‌شود. توالی‌هایی که دقیقاً شامل پورین‌ها و پیریمیدین‌های یک در میان نیستند نیز ممکن است کونفورماسیون Z را به‌دلیل متیلاسیون اتخاذ کنند. تغییرات الگوی متیلاسیون که همراه با فرایند تنظیم بیان ژن می‌باشند، از نقش احتمالی Z-DNA در تنظیم ژن حمایت می‌کنند. هرچند، هنوز Z-DNA در DNA داخل بدن یافت نشده است.

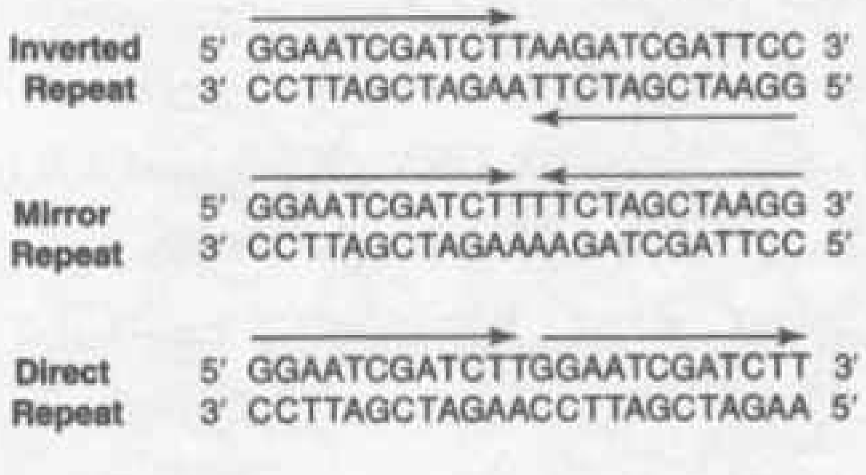
ساختمان DNAهای غیررسمی

A-، B- و Z-DNA اساساً با تنوع در کونفورماسیون اجزاء نوکلئوتیدی DNA ارتباط دارند. هم‌اکنون مشخص شده است که حتی B-DNA رسمی[1] یک ساختمان مستقیم، یکنواخت و یک شکل نیست. در عوض، به‌دلیل تعامل با پروتئین‌های مختلف، DNA تا شده و تولید ساختمان‌های غیرمعمولی نظیر صلیب‌ها یا آرایش‌های سه-رشته می‌کند. به‌نظر می‌رسد که این تنوع‌ها در کونفورماسیون DNA، موضوع تکراری مهمی در فرایند شناسایی مولکولی DNA توسط پروتئین‌ها و آنزیم‌ها باشد. تنوع در ساختمان یا کونفورماسیون DNA توسط موتیف‌های توالی اختصاصی DNA نظیر تکرارهای معکوس[2]، پالیندروم‌ها، تکرارهای آینه‌ای[3]، و تکرارهای مستقیم[4] (شکل ۲۴-۲)، و همچنین توالی‌های هُموپورینی-هُموپیریمیدینی، قطعات فاز A[5]، و نواحی غنی از G مساعدت می‌شوند. توالی‌های غنی از AT که سبب جداسازی راحت رشته‌ها می‌شوند، در نزدیکی مبدأهای همانندسازی DNA قرار دارند. ژنوم انسانی غنی از توالی‌های هُموپورین-هُموپیریمیدین و قطعات یک در میان پورین-پیریمیدین است.

DNA خمیده

توالی‌های DNA که ۴ تا ۶ آدنین به فواصل ۱۰ جفت باز (bp) دارند، تولید کونفورماسیون‌های خمیده[6] می‌کنند. مطالعات ساختمانی نشان داده‌اند که شیارهای کوچک این توالی‌ها تحت فشار قرار دارند. هر چند، مشخص نیست که خمیدگی به‌دلیل این خصوصیت است یا از مرز بین این کونفورماسیون غیرمعمول و B-DNA طبیعی حاصل می‌شود. به‌نظر می‌رسد

1. Canonical 2. Invertes repeats 3. Mirror repeats 4. Direct repeats 5. Phased A 6. Bent



شکل ۲۴-۲ **عناصر تقارن در توالی‌های DNA.** سه نوع عنصر تقارن برای توالی‌های DNA دو ـ رشته نشان داده شده است. پیکان‌ها ارتباط فضایی این عناصر را در هر کدام از این توالی‌ها نشان می‌دهند. در تکرارهای معکوس، یا پالیندروم‌ها، هر رشته DNA مکمل خود را در ناحیه معکوسی دارد که حاوی عناصر تقارن است. یک تکرار آینه‌ای با وجود جفت‌های بازی یکسان با فاصله برابر از یک مرکز تقارن در داخل قطعه DNA مشخص می‌شود. تکرارهای مستقیم نواحی از DNA هستند که در آنها یک توالی خاص تکرار می‌شود. نیازی نیست این تکرارها در مجاورت یکدیگر قرار داشته باشند.

خمیدگی DNA عنصر پایه در تعامل بین توالی‌های DNA و پروتئین‌هایی است که فرایندهای اصلی، نظیر همانندسازی، رونویسی و نوترکیبی با ویژگی جایگاه، را کاتالیز می‌کنند. خمیدگی که توسط تعاملات DNA با آنزیم‌ها و پروتئین‌های دیگری نظیر **هیستون‌ها** القاء می‌شود، نیازی به شرایط توالی نوکلئوتیدی ندارد که مورد نیاز تاشدن DNA بدون پروتئین است. خمیدگی همچنین در اثر آسیب فتوشیمیایی یا بدجفت‌شدگی بازها به‌وجود می‌آید و به‌عنوان پیام شناسایی برای شروع ترمیم DNA عمل می‌کند. آنتی‌بیوتیک‌های ضدتوموری که تولید ساختمان‌های خمیده می‌کنند، در ارتباط بالینی ۳-۲ مورد بحث قرار گرفته‌اند.

DNA صلیبی

با از بین رفتن پیوندهای هیدروژنی بین رشته‌های مکمل و تولید پیوندهای هیدروژنی درون زنجیری در ناحیه‌ای از یک تکرار معکوس، همراه با تولید یک ساختمان صلیبی شکل[1] می‌باشد که نیاز به جداشدن ۳ تا ۴ جفت باز در انتهای «سنجاق[2]» دارد. (شکل ۲۵-۲) برحسب توالی، این ساختمان‌ها ممکن است تنها به میزان مختصری ناپایدار شوند، زیرا ریشه‌های موجود در قوس[3] می‌توانند در انتهای مارپیچ متراکم باقی بمانند.

تصور می‌رود که تکرارهای معکوس ممکن است به‌عنوان سوییچ‌های ملکولی برای همانندسازی و رونویسی عمل کنند. تکرارهای معکوس کاملاً در ژنوم انسانی پخش هستند و اغلب در نزدیکی نواحی کنترلی فرضی ژن‌ها و یا در مبداء همانندسازی DNA قرار دارند. نشان داده شده است که ساختمان‌های صلیبی شکل در مبداء همانندسازی DNA در

1. Cruciform 2. Hairpin 3. Loop

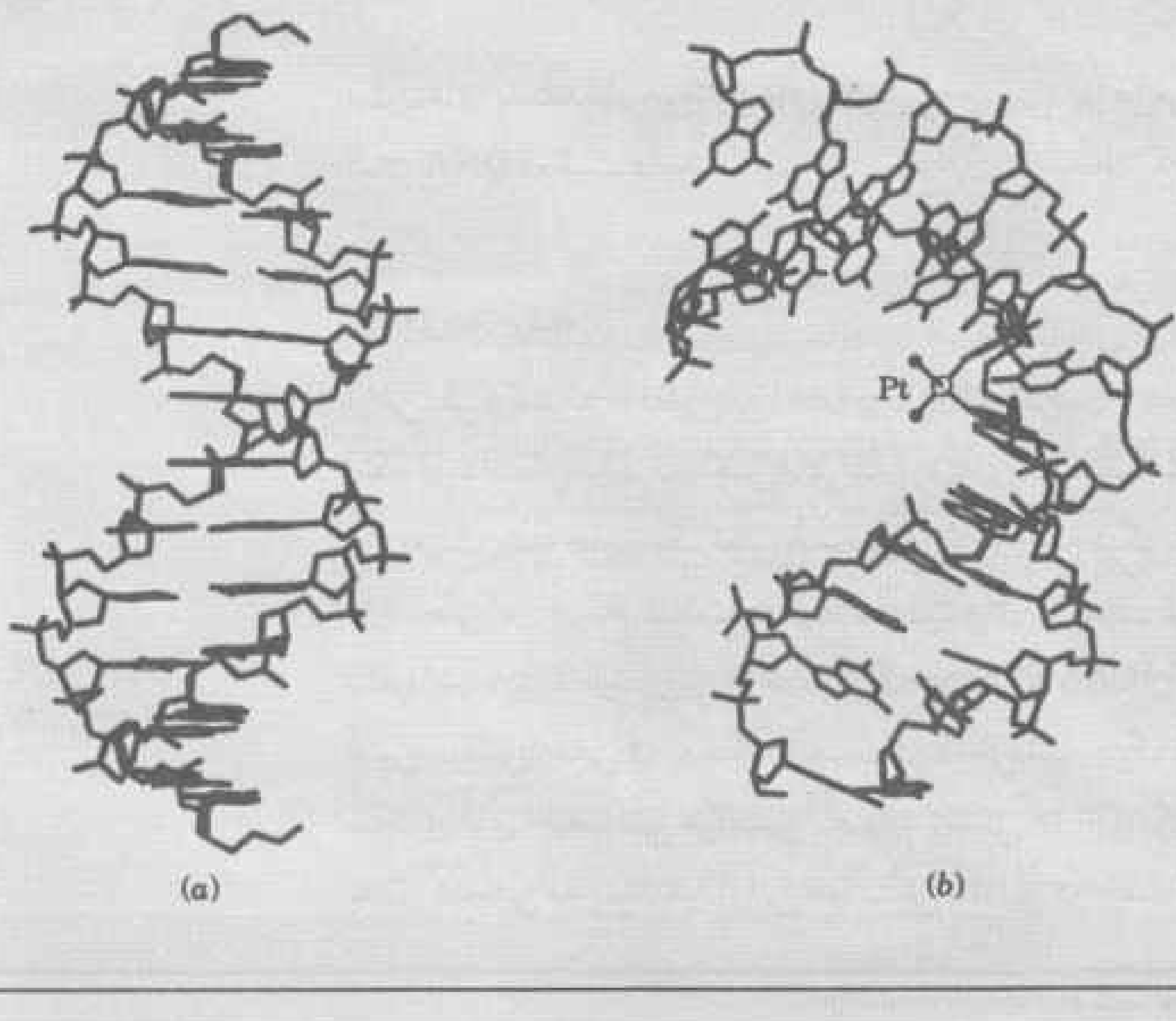
ارتباط بالینی ۳-۲

آنتی‌بیوتیک‌های ضدتومور که شکل DNA را تغییر می‌دهند

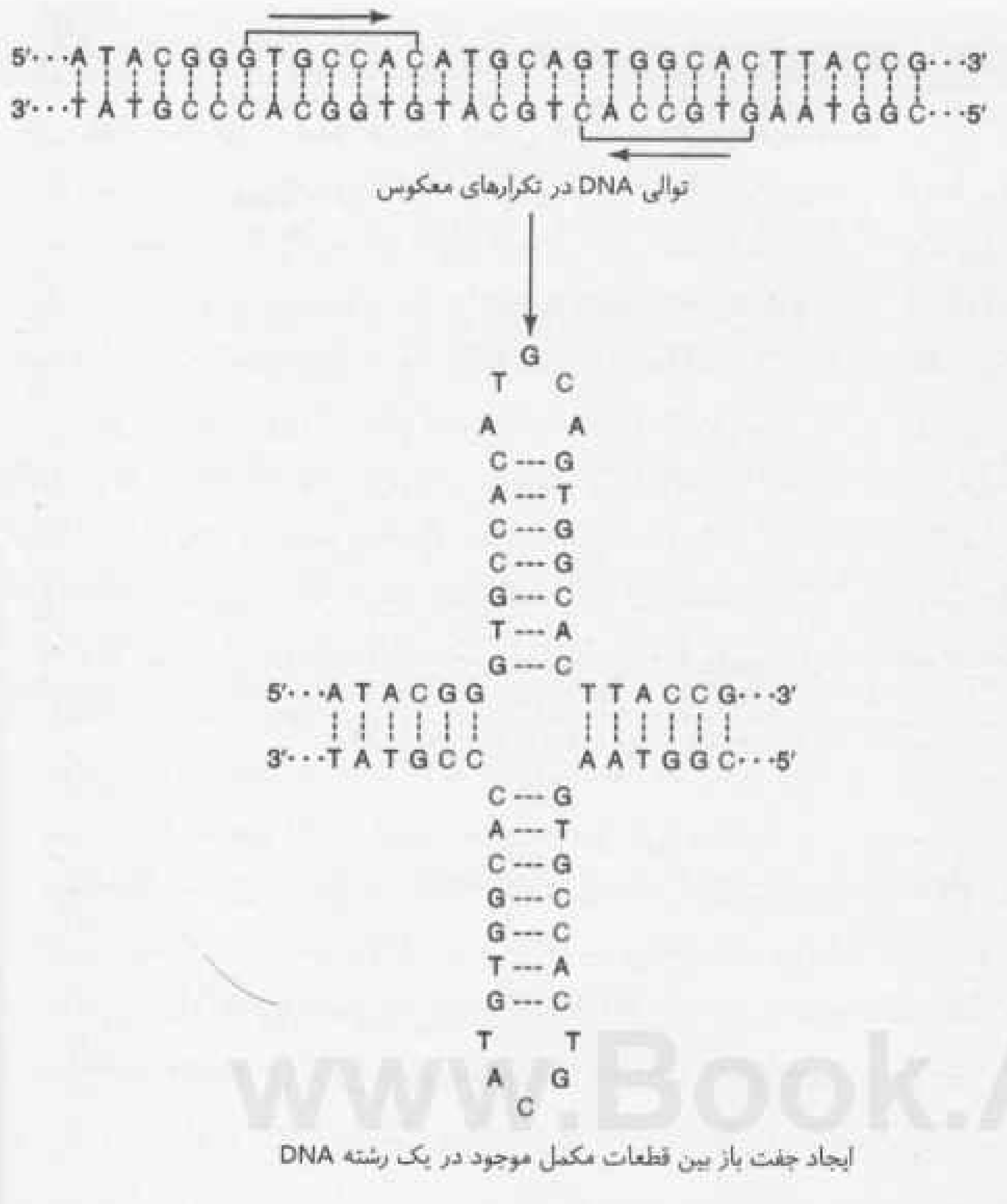
ساختمان سه-بُعدی موضعی DNA در تعامل با پروتئین‌های درگیر در ترمیم، رونویسی، نوترکیبی و متراکم‌سازی کروماتین مهم است. اعتقاد بر این است که آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند سبب القاء تولید ساختمان‌های DNAای شوند که این پروتئین‌های دارای نتایج سیتوتوکسیک را فرا بخوانند. نمونه‌ای که بیشترین مطالعه بر روی آن انجام شده است، داروی ضدتومور سیس-پلاتین، یک کمپلکس چهارکوئوردینانت پلاتینیوم $(cis-Pt(NH_3)Cl_2)$، است. از سیس‌پلاتین به‌تنهایی یا همراه با سایر عوامل ضدتومور در درمان انواع مختلفی از تومورها، شامل سرطان‌های بیضه، تخمدان، استخوان و ریه استفاده می‌شود. این دارو اتصالات عرضی بین‌زنجیری و درون‌زنجیری در DNA دو-رشته به‌وجود می‌آورد که اداکت اخیر ۹۰٪ ضایعات DNA را تشکیل می‌دهند. این پیوندها از جایگزینی لیگاندهای کلراید بر روی پلاتینیوم توسط اتم‌های N7 دو گوانین مجاور حاصل می‌شوند.

مطالعات ساختمانی بر روی اداکت DNA با اتصال عرضی درون زنجیری نشان می‌دهند که مارپیچ دو رشته قویاً به سمت شیار بزرگ خم می‌شود. در شکل زیر، (a) DNA طبیعی، و (b) اداکت DNA.

ساختمان‌های خمیده اداکت سیس‌پلاتین-DNA به‌طور اختصاصی توسط پروتئین‌های اتصال به DNAای نظیر پروتئین‌های ترمیم برداشت نوکلئوتیدی (NER) و پروتئین‌های اتصال به DNA غیرهیستونی نظیر HMG-1 مورد شناسایی قرار می‌گیرند. سیتوتوکسیسیتی اداکت‌های سیس-پلاتین یک فرایند پیچیده است که به‌واسطه تعاملات اختصاصی با این پروتئین‌ها رخ می‌دهد. فرایندهای سلولی نظیر رونویسی و آپوپتوز نیز تحت تأثیر تولید اداکت‌های سیس‌پلاتین-DNA قرار می‌گیرند. این ضایعات و کمپلکس‌های اداکت-پروتئین احتمال تداخل با رونویسی را دارند. فراخوانی پروتئین‌های NER برای ترمیم ضایعه است، در حالی‌که ترمیم برداشتی همراه با احتمال تولید شکست‌های رشته DNA می‌باشد. تجمع این شکست‌ها نهایتاً سبب القاء آپوپتوز می‌شود، زیرا DNA برای فعالیت، زیادی آسیب دیده است. تعاملات اداکت سیس‌پلاتین-DNA با پروتئین‌های HMG ممکن است در سمّیت آن نیز نقش داشته باشد. اتصال پروتئین‌های HMG ممکن است به غلط پیام دهد که ناحیه آسیب‌دیده DNA از نظر رونویسی فعال است و مانع متراکم‌شدن آن به ساختمان‌های تا شده کروماتینی شوند. این ساختمان‌ها همچنین با محافظت اداکت‌های سیس پلاتین-DNA در برابر ترمیم، سبب باقیماندن این ضایعه‌ی می‌شوند.



(a) (b)



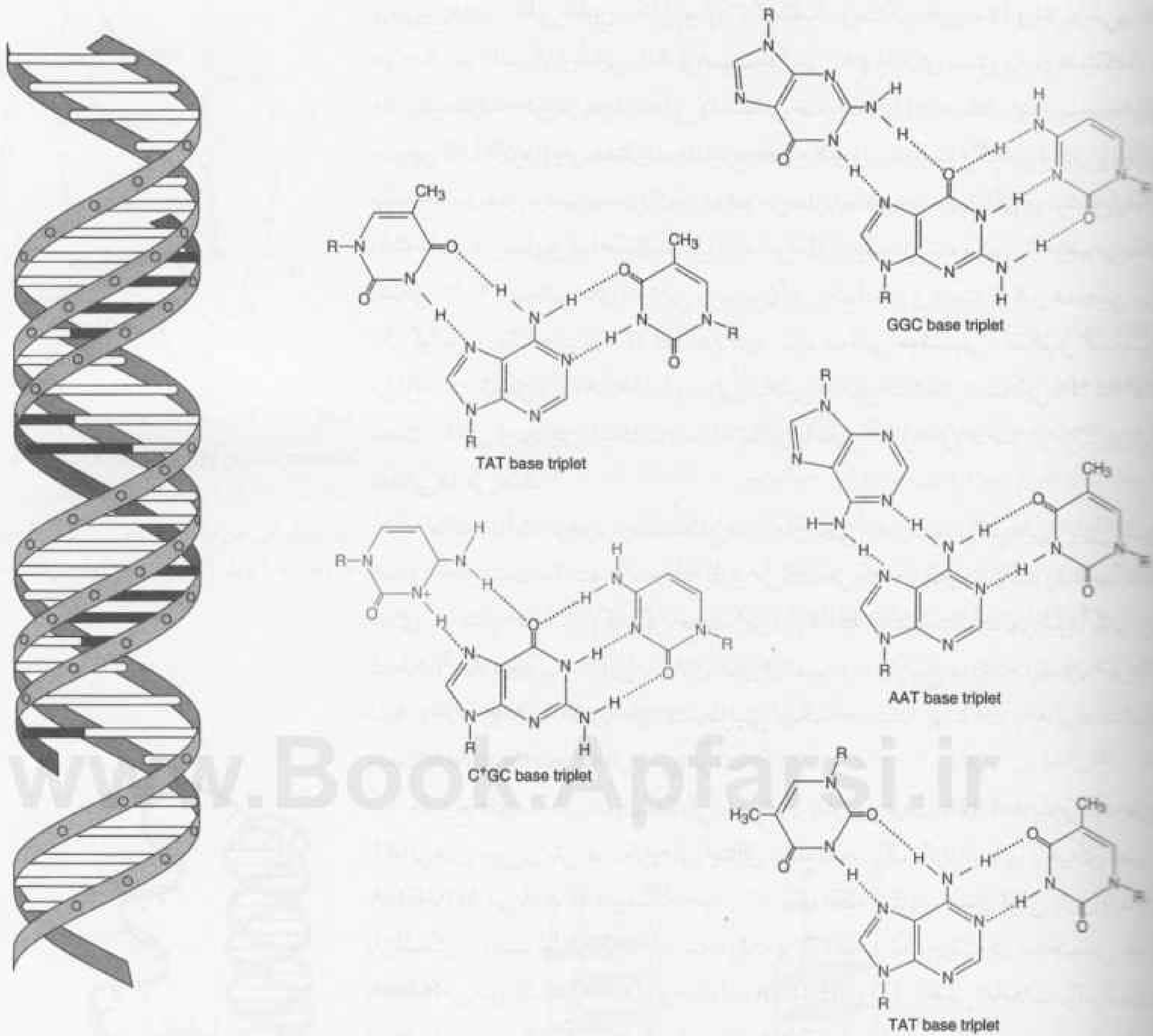
شکل ۲۵-۲ تولید ساختمان‌های صلیبی در DNA. برای ایجاد شرایط تولید ساختمان‌های صلیبی، وجود تکرارهای معکوس در DNA دو-رشته لازم است ولی کافی نمی‌باشد. در DNA شُل، ساختمان‌های صلیبی احتمالاً تولید نمی‌شوند، زیرا DNA خطی نسبت به ساختمان صلیبی را از نظر ترمودینامیکی نامساعد می‌کند. بازشدن همراه با ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین‌رشته‌ای در بین دو قسمت قرینه تکراری در جهت تولید ساختمان صلیبی می‌باشد. در نواحی از DNA که حاوی تکرارهای آینه‌ای هستند، تولید ساختمان‌های صلیبی مساعد نمی‌باشد، زیرا این ساختمان‌های صلیبی از رشته‌های DNA موازی همسو و نه‌موازی ناهمسو ساخته می‌شوند در عوض، برخی تکرارهای آینه‌ای تمایل به تولید مارپیچ‌های سه‌تایی دارند.

سلول‌های پستانداران، پروتئین‌های اتصالی-صلیبی [1] را فرا می‌خوانند که در هنگام شروع سنتز DNA فعالیت دارند.

DNA سه-رشته

برخی پلی‌نوکلئوتیدها نظیر پلی (dA) و پلی (dT) ترکیب شده و به‌جای مارپیچ‌های دو-رشته مورد انتظار، تولید کمپلکس‌های سه-رشته‌ای می‌کنند. استوکیومتری این کمپلکس‌ها نیاز به یک رشته حاوی یک توالی هُموپورینی و دو رشته دیگر با توالی‌های هُموپیریمیدینی دارد. حتی در هنگام شرکت در ایجاد جفت‌های واتسون-کریک، پورین‌ها دو جایگاه بالقوه ایجاد پیوند هیدروژنی در شیار بزرگ دارند: N7 و O6 از گوانین و N7 و $6-NH_2$ از آدنین. نوکلئوبازهایی که به شکل مناسب در داخل شیار بزرگ قرار می‌گیرند، قادر به ایجاد سه‌بازی‌های اختصاصی **هوگستین** [2] هستند (شکل ۲۶-۲). برای مثال، یک تیمین می‌تواند به‌طور انتخابی دو پیوند هیدروژنی هوگستینی با آدنین در جفت A-T به‌وجود آورد. به‌علاوه

1. Cruciform-binding proteins 2. Hoogsteen base triplets



(a) (b)

شکل ۲۶-۲ مارپیچ‌های سه‌تایی. (a) مارپیچ سه‌تایی هوگستینی. پیوندهای هیدروژنی هوگستینی بین یک رشته هُموپورینی یک مارپیچ دوتایی و یک رشته هُموپیریمیدینی موازی در شیار بزرگ. سه بازی‌های هم‌شکل TAT و C+GC امکان اتصال انتخابی توالی را فراهم می‌سازند. (b) مارپیچ سه‌تایی هوگستینی معکوس. مارپیچ‌های سه‌تایی می‌توانند از طریق اتصال موازی ناهمسوی یک اولیگونوکلئوتید در شیار بزرگ به رشته هُموپورین یک مارپیچ دوتایی واتسون-کریک تشکیل شوند. ایجاد پیوندهای هیدروژنی هوگستینی معکوس سبب تولید سه‌تایی احتمالی می‌شود: GGC، AAT، و TAT. آخرین سه‌تایی هم‌شکل با بقیه نیست، زیرا قندها (با R مشخص شده‌اند) موقعیت متفاوتی نسبت به جفت باز واتسون-کریک دارند.

یک سیتوزین پروتونه می‌تواند دو پیوند هوگستینی H با گوانین یک جفت G-C به‌وجود آورد و منجر به تولید سه‌بازی هم‌شکل[1] با T-A-T شود. pK'_a سیتیدین تقریباً ۴٫۵ است،

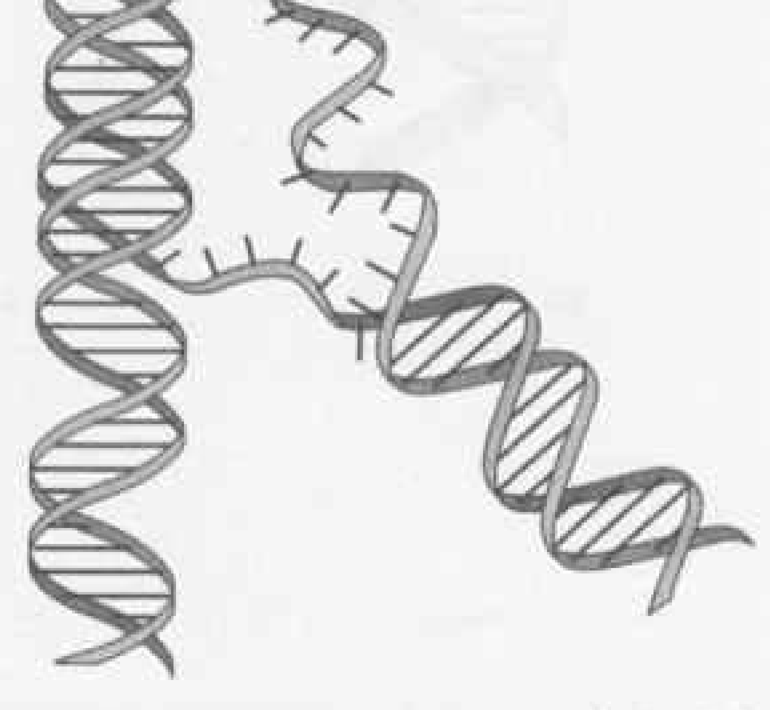
1. Isomorphous

و مارپیچ‌های سه‌تایی حاوی سه‌تایی‌های C-G-C یک وابستگی قوی به pH را نشان می‌دهند. هر چند، اثر قالب‌گیری [1] این سه‌تایی سبب افزایش pK'_a ظاهری سیتوزین می‌شود که آن را قادر می‌سازد تا حتی در محلول‌هایی که اسیدی ضعیف (pH۶) هستند، تولید مارپیچ‌هایی سه‌تایی کند. الگوهای بی‌همتای ایجاد پیوندهای هیدروژنی هوگستین گوانین و آدنین، ویژگی مشابه جفت‌های واتسون-کریک را فراهم می‌سازند. تغییر در جهت‌گیری نوکلئوبازهای رشته-سوم در شیار بزرگ، امکان تشکیل سه‌تایی‌های هوگستینی-معکوس را فراهم می‌سازد (شکل ۲۶-۲). سه‌تایی‌های انتخابی را می‌توان بین یک آدنین و جفت A-T و همچنین بین یک گوانین و یک جفت G-C به‌وجود آورد. یک سه‌تایی **هوگستینی-معکوس** همچنین می‌تواند بین تیمین و A-T ایجاد شود، ولی سه‌تایی حاصل هم‌شکل با سه‌تایی Pu*Pu*Py نیست. با این وجود این، اسکلت قادر به تطابق با تغییر شکل‌های حاصل از قرارگیری این سه‌تایی‌ها می‌باشد.

همانند حالت موجود در کمپلکس‌های مارپیچی-دورشته، تراکم‌پذیری بازی نقش کلیدی را در تثبیت ساختمان سه‌رشته بازی می‌کند. هر چند، با قرار دادن سه رشته اسکلت دارای بار منفی در کنار یکدیگر، سبب افزایش دافعه الکترواستاتیک می‌شود. بنابراین، کمپلکس مارپیچی-سه‌تایی پایداری کمتری نسبت به مارپیچ دورشته واتسون-کریک دارد. وجود Mg^{2+} یا کاتیون‌های چندظرفیتی دیگر، به‌واسطه پوشاندن بارهای فسفات، سبب پایداری مارپیچ سه‌تایی می‌شوند.

مارپیچ‌های سه‌تایی درون ملکولی را می‌توان با از بین بردن DNA مارپیچی-دوتایی با توالی‌های پلی‌پورینی در تکرارهای آینه‌ای تولید نمود. یک تکرار آینه‌ای ناحیه‌ای نظیر AGGGGA می‌باشد که در هنگام خواندن از یک نقطه مرکزی، همان توالی بازی را دارد. بازتاشدگی [2] سبب تولید یک ناحیه سه-رشته و یک قوس تک-رشته در ساختمانی به‌نام H-DNA می‌شود (شکل ۲۷-۲). گرچه تولید H-DNA، به دلیل کاهش تعاملات تراکم‌پذیری، از نظر ترمودینامیکی نامساعد است، وقتی DNA تحت **استرس ابرمارپیچی** [3] قرار دارد، مارپیچ‌های سه‌تایی درون ملکولی در DNA سلولی یافت شده‌اند. **ابرماپیچ‌شدن DNA** انرژی مورد نیاز برای بازشدن DNA را فراهم می‌سازد که خود برای تشکیل مارپیچ سه‌تایی لازم است. تشکیل سه-رشته سبب شُل‌سازی ابرفنرهای منفی می‌شوند. همچنین، اتصال پروتئین‌ها به DNA تک-رشته ممکن است سبب پایداری بیشتر ساختمان H-DNA و جلوگیری از تخریب قوس توسط نوکلئازها گردد.

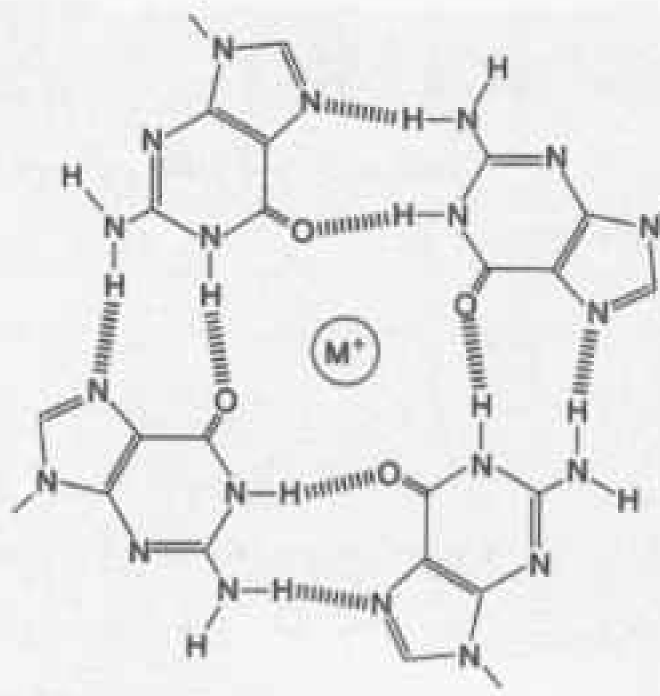
بسیاری از توالی‌های موجود در ژنوم اوکاریوت‌ها، پتانسیل تولید ساختمان‌های DNA سه-رشته را دارند. این نواحی با فراوانی بیشتر از میزان مورد انتظار نسبت به تنها ملاحظات احتمالی، وجود دارند. قطعات پلی‌پورینی با طول بیش از ۲۵ نوکلئوتید، تا ۰٫۵٪ ژنوم برخی اوکاریوت‌ها را شامل می‌شوند. این نواحی بالقوه مارپیچی-سه‌تایی به‌خصوص در



شکل ۲۷-۲ مارپیچ‌های سه‌تایی درون ملکولی: H-DNA. نواحی پلی‌پورینی-پلی‌پیریمیدینی DNA با یک تقارن تکراری آینه‌ای می‌توانند یک مارپیچ سه‌تایی درون ملکولی به‌وجود آورند که در آن رشته سوم در شیار بزرگ قرار دارد، در حالی‌که رشته مکمل یک کونفورماسیون تک-رشته را اتخاذ می‌کند.

1. Templating effect 2. Refolding 3. Superhelical sterss

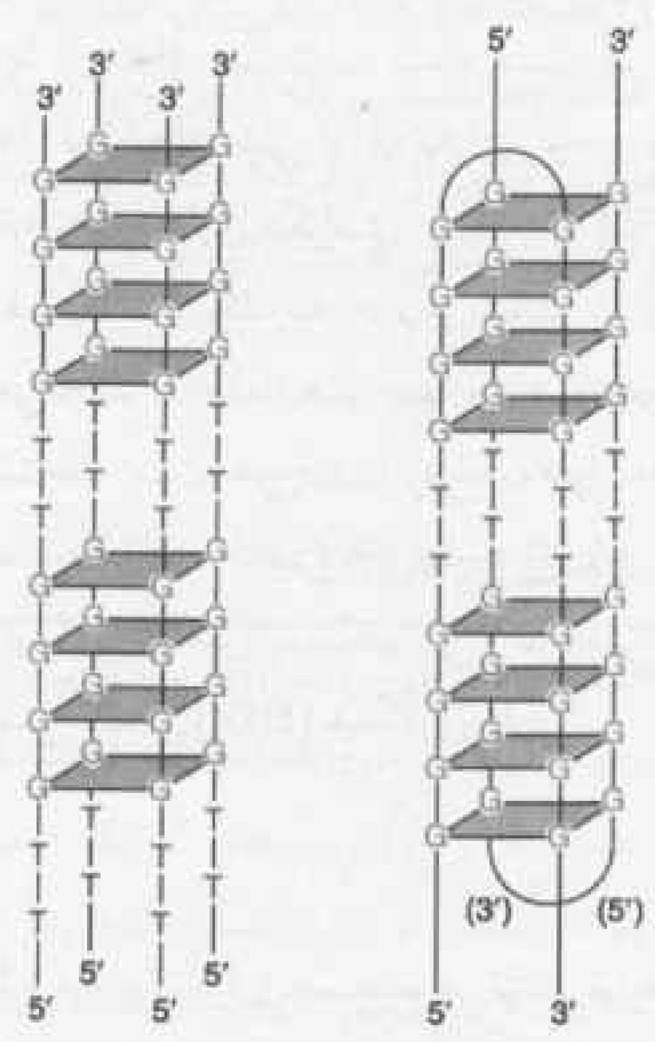
ترکیبی توالی‌های متداول هستند که در تنظیم ژن نقش دارند. به همین دلیل، تصور می‌رود که H-DNA ممکن است نقشی را در کنترل سنتز RNA بازی کند (ارتباط بالینی ۴-۲). وظایف بیولوژیکی بالقوه دیگری، نظیر نقش احتمالی در شروع و خاتمه همانندسازی و نوترکیبی، نیز برای DNA مارپیچی-سه‌تایی مطرح شده است. توانایی‌های DNA مارپیچی-سه‌تایی در تداخل با رونویسی همچنین منجر به تلاش‌هایی در جهت استفاده از مارپیچ‌های سه‌تایی بین‌ملکولی در کنترل سنتز RNA ساختگی و سنتز بعدی پروتئین شده است.



شکل ۲۸-۲ **ساختمان یک چهارتایی-G.** چهار گوانین هم‌صفحه از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی هوگستینی یک ساختمان تترامری را به‌وجود می‌آورند. حفره موجود در مرکز این چهارتایی می‌تواند یک یون سدیم یا پتاسیم را در خود جا دهد که با چهار اکسیژن 6-O کوئوردینانت می‌شود.

DNA چهار-رشته

نوکلئوتیدهای گوانینی و پلی‌نوکلئوتیدهای شدیداً غنی از G تولید ساختمان‌های تترامری خاصی تحت عنوان **چهارتایی-G**[1] می‌کنند که حاوی مجموعه مسطحی از گوانین‌هایی هستند که از طریق پیوندهای هیدروژنی هوگستینی به یکدیگر اتصال دارند (شکل ۲۸-۲). پلی‌نوکلئوتیدها می‌توانند طوری تعامل کنند که **چهاررشته‌هایی**[2] را به‌وجود آورند که در آنها چهارتایی‌های-G بر روی یکدیگر متراکم شده تا تولید یک ساختمان چند لایه شود (شکل ۲۹-۲). این ساختمان‌ها توسط Na^+ و K^+ تثبیت می‌شوند که با اکسیژن‌های گوانین (O6) در مرکز صفحه چهارتایی یا بین دو صفحه مجاور تعامل می‌کنند. این کاتیون‌ها هم به طریق الکترواستاتیکی با خنثی‌سازی بارهای منفی موجود در چهار رشته پلی‌نوکلئوتید و هم از نظر آنتروپی از طریق آزادسازی تعداد زیادی ملکول آب به داخل حجم بزرگ محلول، سبب تثبیت کمپلکس می‌شوند.



شکل ۲۹-۲ **DNA چهار رشته-G.** از تراکم‌پذیری چهارتایی-G احتمال تولید ساختمان‌های چهار-رشته وجود دارد. ساختمان‌های چهار رشته ممکن است موازی همسو یا ناهمسو باشند (یک آرایش احتمالی نشان داده شده است). ساختمان موازی ناهمسو ممکن است توسط توالی‌های غنی از G موجود در DNA تلومری تولید شود.

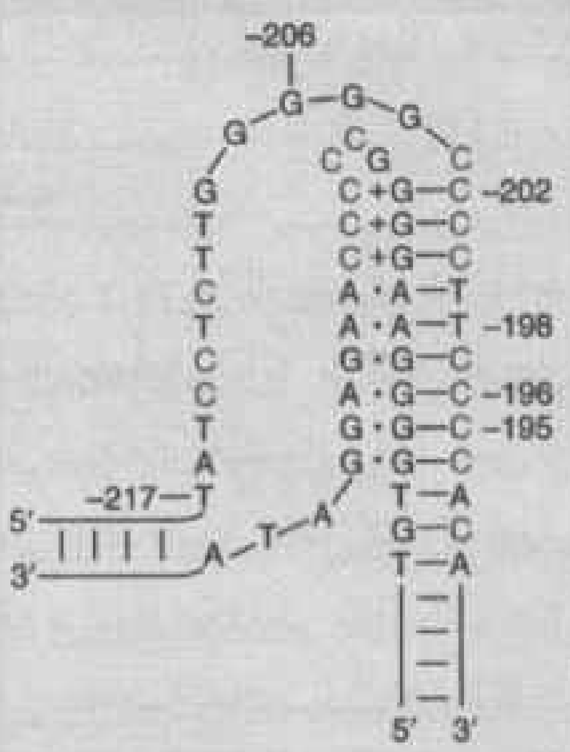
1. G-quartet 2. Tetraplexes

ارتباط بالینی ۴-۲

دوام ارثی هموگلوبین جنینی

دوام ارثی هموگلوبین جنینی[1] (HPFH) (OMIM۱۴۱۷۴۹) گروهی از شرایطی است که در آن سنتز هموگلوبین جنینی در زمان تولد خاتمه نیافته و تا دوران بزرگسالی ادامه می‌یابد. شکل هُموژنوس این حالت بسیار نادر است که با تغییرات گلبول‌های قرمز خون مشابه تغییرات موجود در ناهنجاری خونی ژنتیکی β-تالاسمی مشخص می‌شود. HPFH به شکل هُموزیگوس یا هتروزیگوس، همراه با ناهنجاری‌های بالینی یا هماتولوژیکی خفیف است. گاهی ممکن است دردهای عضلانی-اسکلتی خفیفی وجود داشته باشد، ولی بیماران مبتلا به HPFH اغلب بدون علامت هستند.

این حالت نتیجه نارسایی در توقف رونویسی ژن‌های گلوبین A_γ و G_γ انسانی است که منجر به افزایش میزان هموگلوبین جنینی می‌شود. تولید یک ساختمان DNA سه-مارپیچی داخل ملکولی که حدود ۲۰۰ bp در فرادست (بین موقعیت‌های ۱۹۴- و ۲۱۵-) محل شروع رونویسی ژن‌های گلوبین γ قرار دارد، به‌عنوان ترمزی برای بیان آنها می‌باشد. در یک یا چند موقعیت ژن‌های هموگلوبینی این بیماران، جهش‌هایی وجود دارند که سبب کاهش پایداری این مارپیچ سه‌تایی و کاهش توانایی مهار سنتز این پروتئین می‌گردند.



1. Hereditary persistence of fetal hemoglobin

در حالی‌که چهاررشته‌های-G با انکسار اشعه-X و اسپکتروسکوپی NMR مشاهده شده‌اند، وجود آنها در داخل بدن ثابت نشده است. هر چند، در انتهای **کروموزوم‌های** اوکاریوتی (تلومرها) توالی‌های غنی از G تکراری وجود دارند. تلومرهای انسانی حاوی ۲۴۰۰-۸۰۰ نسخه توالی تکراری هگزامری $d(TTAGGG)_n$ هستند که به یک تک-رشته آویخته[1] با طول تقریبی ۱۵۰ نوکلئوتید ختم می‌شوند. در آزمایشگاه، اولیگونوکلئوتیدهایی دارای این توالی می‌توانند ساختمان‌های چهاررشته به‌وجود آورند. نقش چهاررشته‌ها در عملکرد تلومر ناشناخته است. هر چند، تلومرها به‌عنوان اهدافی برای شیمی‌درمانی‌های ضدسرطان جدید مورد توجه خاصی قرار دارند (ارتباط بالینی ۵-۲). به‌علاوه، چهار-رشته‌های-G در نوترکیبی ژن‌های ایمونوگلبولینی و در دیمریزاسیون RNA ژنومی دو-رشته ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) همکاری دارند.

DNA لغزیده

نواحی از DNA با تقارن تکراری مستقیم می‌توانند تولید DNA بدجفت‌شده لغزیده[2] (SMP-DNA) کنند. برای این منظور نیاز به بازشدن مارپیچ دوتایی، صف‌بندی مجدد،

1. Overhang 2. Slipped mispaired DNA

ارتباط بالینی ۵-۲

تلومراز به‌عنوان هدفی برای عوامل ضدسرطانی

تلومرها، انتهاهای مربوط به کروموزوم‌های اوکاریوتی، برای حفظ پایداری ژنوم حیاتی هستند. این انتهاها در هر دور تقسیم سلولی به شکل پیشرونده‌ای کوتاه می‌شوند و وقتی به یک حد بحرانی رسیدند، آپوپتوز را آغاز می‌کنند. تلومراز در جهت حفظ یا افزایش طول تلومرها عمل می‌کند، ولی در سلول‌های پیکری طبیعی فعال نیست. فعالیت تلومراز موجود در اکثر رده‌های سلول توموری ممکن است مسئول نامیرایی آنها باشد و وقتی افزایش می‌یابد، با پیش‌آگهی بالینی ضعیف‌تر همراه است.

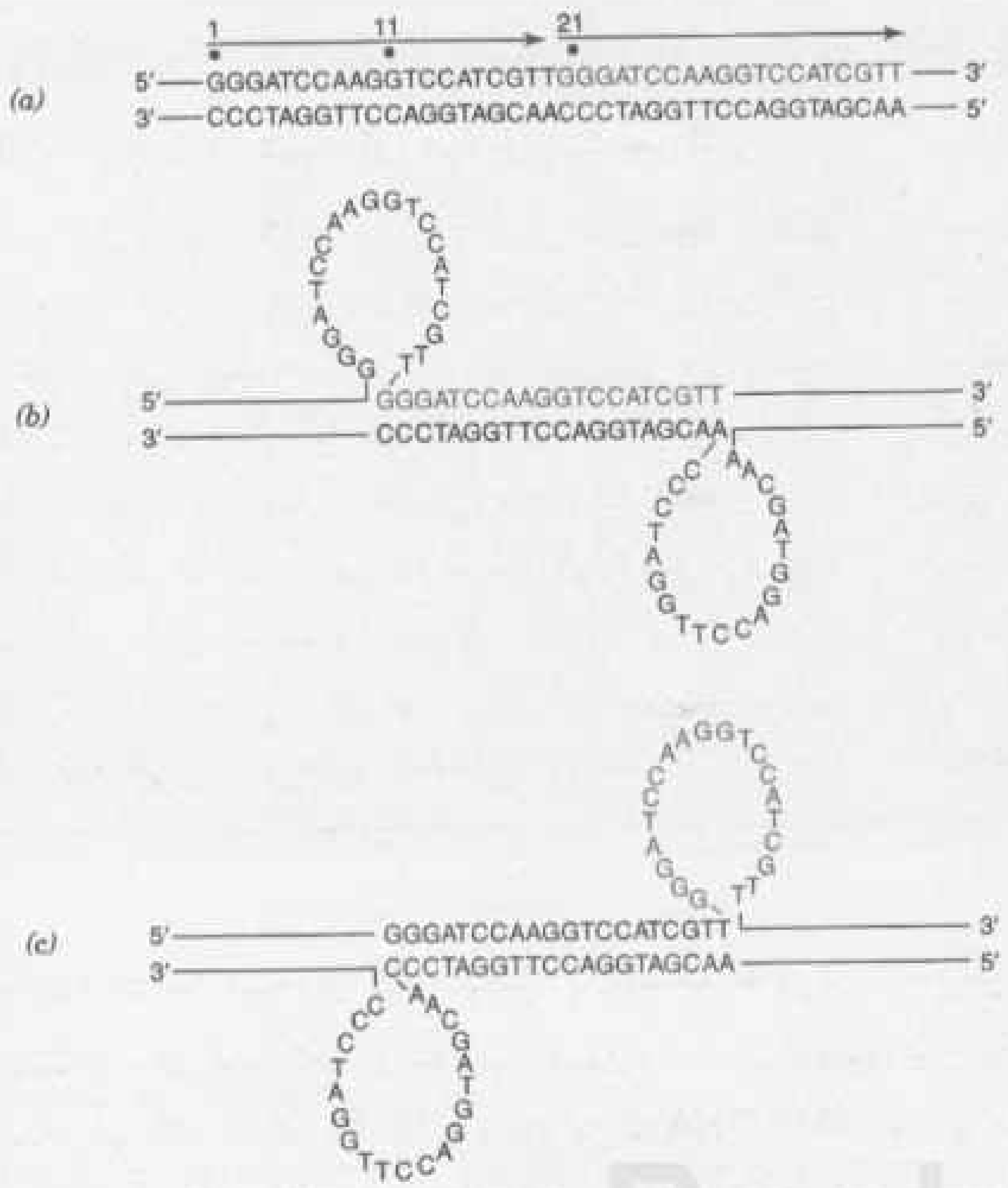
دو راه برای مهار انتخابی تلومراز مورد بررسی قرار گرفته است. اولین راه مستلزم هدف‌گیری بخش حاوی RNA این آنزیم است. این RNA به‌عنوان الگویی برای امتداد توالی تکراری تلومری عمل می‌کند. اسیدهای نوکلئیک با اسکلت‌های قند-فسفات تغییریافته به RNA تلومراز در سلول‌های نامیرای انسانی اتصال یافته و از طریق مهار فعالیت آن، نهایتاً منجر به مرگ سلول می‌شوند. برای مقاومت در برابر تخریب نوکلئازی و فراهم‌سازی تمایل بالا برای تشکیل کمپلکس‌های مارپیچی- دوتایی با RNA، از اسیدهای نوکلئیک تغییریافته استفاده شده است. راه دوم مستلزم استفاده از داروهایی است که به DNA چهاررشته-G اتصال می‌یابند. ملکول‌های آروماتیک بزرگی نظیر پورفیرین‌ها و آنتراکینون‌ها به‌طور انتخابی به ساختمان‌های DNA چهاررشته-G اتصال یافته و آنها را پایدار می‌کنند.

وجفت‌شدن بعدی یک نسخه از تکرار مستقیم با یک نسخه مجاور در رشته دیگر می‌باشد. بدین ترتیب تولید دو قوس تک-رشته می‌شود. دو ساختمان ایزومری برای یک SMP-DNA ممکن می‌باشد (شکل ۳۰-۲). با وجود این که SMP-DNA هنوز در داخل بدن مورد شناسایی قرار نگرفته است، شواهد ژنتیکی مطرح می‌کنند که این نوع DNA در جهش‌های تغییرقالب خود به خودی دخالت دارد که منجر به افزودن یا حذف تک‌بازها در هر دور می‌شوند (شکل ۳۱-۲). حذف‌ها و دوتاشدگی‌های قطعات DNAی که بزرگتر از یک باز هستند، می‌توانند در هنگام همانندسازی DNA بین تکرارهای مستقیم رخ داده و منجر به ایجاد ساختمان‌های لغزیده-قوس‌دار شوند. دوتاشدگی برخی تکرارهای سه‌حذفی ساده که اساس چندین بیماری ژنتیکی انسانی هستند (ارتباط بالینی ۶-۲) نیز می‌توانند با این مکانیسم رخ دهند.

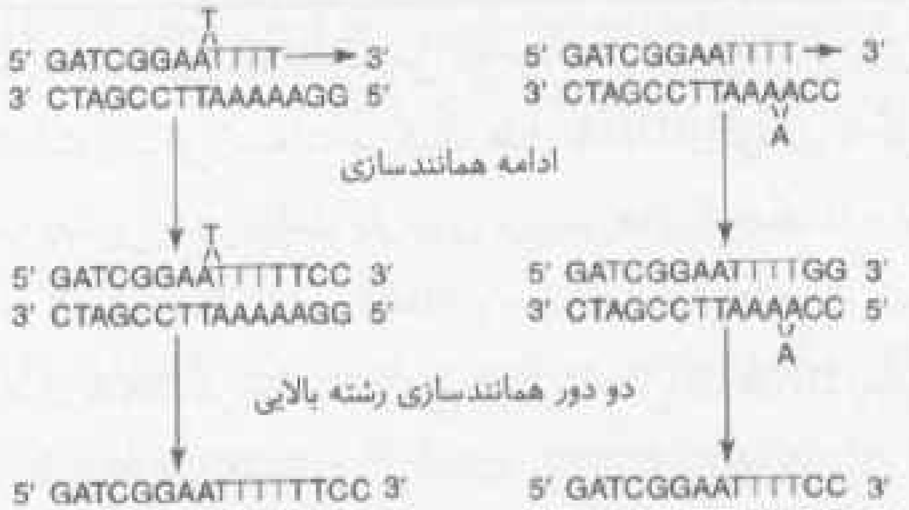
۴-۲ • سطوح-بالاتر ساختمان DNA

به استثناء ویروس‌های حاوی RNA، تمامی موجودات زنده موجود بر روی زمین از DNA برای ذخیره اطلاعات ژنتیکی استفاده می‌کنند. طول DNA از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است و در دامنه چندین هزار جفت باز برای ویروس‌های کوچک تا میلیون‌ها جفت باز برای باکتری‌ها و تا میلیاردها باز در گیاهان و حیوانات قرار دارد. در تمامی موجودات، **طول محوری**[1] (طول DNA در حالت مارپیچ دوتایی شکل B) DNA ژنومی معمولاً بسیار بیشتر از اندازه سلولی است که حاوی آن است. برای مثال، یک ویروس با اندازه متوسط،

1. Contour length



شکل ۳۰-۲ DNA لغزیده بدجفت‌شده. (a) وجود دو تکرار پشت‌سرهم متوالی منجر به دو ایزومر DNA لغزیده بدجفت‌شده می‌شود. (b) نسخه دوم تکرار مستقیم در رشته بالایی با نسخه اول تکرار در رشته پایینی جفت می‌شود. (c) جفت‌شدن اولین نسخه تکرار مستقیم در رشته بالا با نسخه دوم تکرار مستقیم در رشته پایین. در هر کدام از این ایزومرها، دو قوس تک- رشته تولید می‌شود.



شکل ۳۱-۲ جهش‌زدایی تغییر قالب از طریق لغزش DNA. همانندسازی DNA در داخل یک دور یک تک‌باز می‌تواند سبب تولید یک تغییر قالب تک- بازی شود. در این مثال، یک دور از پنج A همانندسازی شده و برحسب این که آیا لغزش DNA در رشته دختر یا رشته الگو رخ می‌دهد، یک T ممکن است به DNA اضافه شده یا از آن حذف گردد.

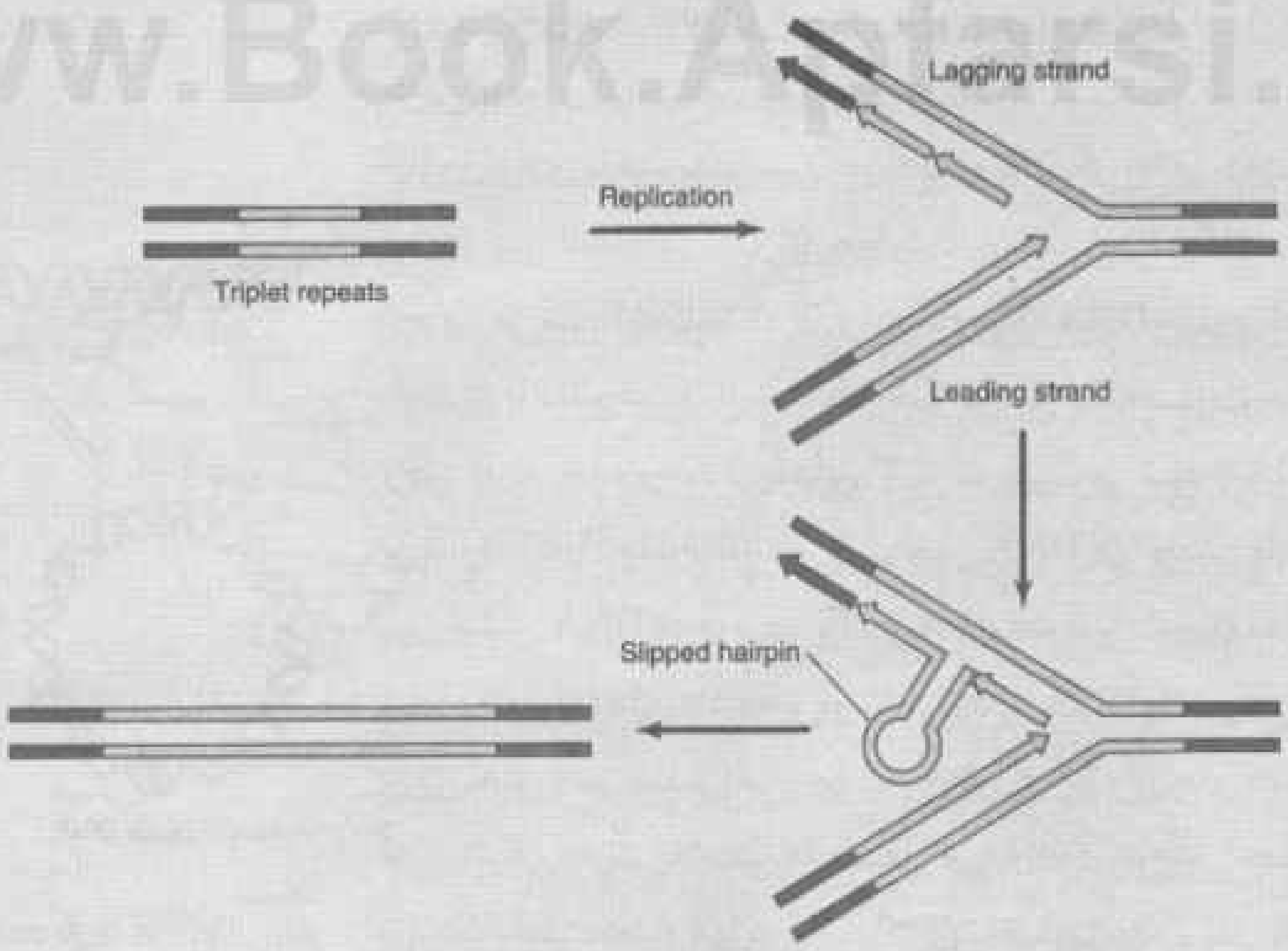
ارتباط بالینی ۶-۲

توسعه تکرارهای سه‌تایی DNA و بیماری انسانی

توالی‌های سه‌جفت بازی تکراری DNA در تعدادی از بیماری‌های ژنتیکی انسان، شامل سندروم X شکننده (OMIM۳۰۰۶۲۴)، دیستروفی میوتونیک (OMIM۱۶۰۹۰۰)، آتروفی عضلانی نخاعی و بصل‌النخاعی (سندروم کندی)، آتاکسی فردریچ و بیماری هانتینگتون (OMIM۱۴۳۱۰۰) وجود دارند. این بیماری‌ها با توسعه تکرارهای سه‌حرفی نوکلئوتیدی که در داخل یا نزدیک ژن‌های اختصاصی ظاهر می‌شوند. در بیماری کندی مشخص شده است که یک تکرار CAG در اولین اگزون ژن گیرنده آندروژن وجود دارد. تکرارهای سه‌حرفی را همچنین می‌توان در داخل نواحی ترجمه نشونده ژن یافت. در آتاکسی فردریچ یک تکرار GAA در داخل یک اینترون، و در دیستروفی میوتونیک، یک تکرار CTG در ناحیه ′۳ - ترجمه‌نشونده این ژن وجود دارد. سندروم X شکننده یکی از علل ایجادکننده عقب‌ماندگی ذهنی است که با توسعه یک سه‌حرفی GCC در سمت ′۵ ژن FMR-1 مشخص می‌شود. این تکرار از ۳۰ نسخه تا هزاران نسخه توسعه می‌یابد. این بیماری زمانی به‌وجود می‌آید که توسعه طبیعی ژن FMR-1 با متیلاسیون جایگاه‌های CpG خاموش شود. در تمامی موارد، توسعه سه‌حرفی با عملکرد طبیعی پروتئین تداخل می‌کند. اغلب کاهش فعالیت پروتئین وجود دارد، ولی گاهی یک فعالیت مضر حاصل می‌شود. این بیماری‌ها با افزایش شدت بیماری در نسل‌های بعدی مشخص می‌گردد که به آن پیش‌افتادگی[1] گفته می‌شود.

توسعه سه‌حرفی ممکن است از بدجفت‌شدن لغزیدگی در هنگام سنتز DNA حاصل شود. به دلیل تقویت وسیعی که مشخصه این بیماری‌ها است، لغزش‌های مکرر یا متعدد می‌بایست در شدت بالای این توسعه نقش داشته باشد. یکی از مکانیسم‌های احتمالی مستلزم لغزش DNA طی سنتز رشته رهبر می‌باشد. این فرایند ممکن است به کمک تشکیل یک ساختمان سنجاقی پایدار توسط قوس لغزیده انجام شود. تکرار این فرایند منجر به تجمع تعداد زیادی تکرار سه‌حرفی می‌شود.

1. Anticipation



نظیر فاژ λ، حاوی bp ۱۰^۴ × ۴٫۸ از DNA می‌باشد که طول آن ۱۶٫۵ μm است. هر چند، این ذره ویروسی تنها ۰٫۱۹ μm طول دارد. باکتری معمول *Escherichia (E.) coli* طولی در حدود ۲ μm و یک کروموزوم با bp ۱۰^۶×۴٫۶ و طول محوری ۱٫۵ mm را دارد. یک

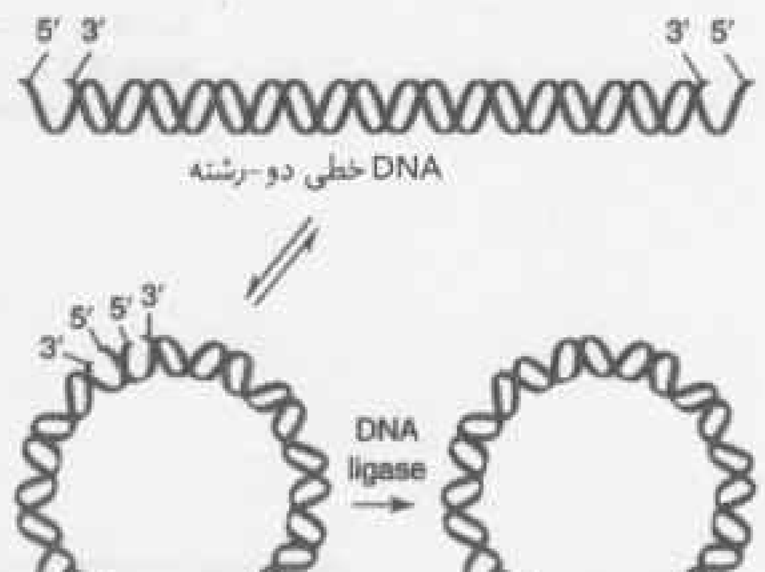
سلول انسانی دیپلوئید حاوی 6×10^9 bp از DNA کروموزومی در ۴۶ کروموزوم است. طول محوری این DNA به ۲m می‌رسد که در داخل هسته‌ای با قطر حدود ۱۰μm بسته‌بندی می‌شود. واضح است که DNA تمامی موجودات می‌بایست با ظرافت خاصی بسته‌بندی شود.

DNA ژنومی ممکن است خطی یا حلقوی باشد

به استثناء برخی باکتریوفاژهای کوچک نظیر φX174 که می‌توانند یک شکل تک-رشته به دست آورند، اکثر ملکول‌های DNA به صورت کمپلکس‌های مارپیچی-دوتایی هستند. برحسب منبع، این کمپلکس‌ها می‌توانند خطی یا حلقوی باشند. برای مثال، ملکول‌های DNA چندین ویروس کوچک از انواع مارپیچ‌های دو-رشته خطی هستند. برخی از این ملکول‌های DNA دارای شکست‌های تک-رشته درونی هستند که به‌طور طبیعی وجود دارند. ساختمان مارپیچی-دوتایی به این دلیل حفظ می‌شود که شکست‌های یک رشته عموماً در موقعیت‌های متفاوت شکست‌های موجود در رشته مکمل می‌باشند. ملکول‌های DNA موجود در اکثر موجودات عالی نیز خطی هستند. هر کدام از ۴۶ **کروموزوم** موجود در یک سلول دیپلوئید انسانی یک DNA مارپیچی-دوتایی به صورت کمپلکس با پروتئین‌ها است.

برخی موجودات ملکول‌های DNAای دارند که در زمان‌های مختلف چرخه زندگی خود یا خطی و یا حلقوی هستند. قبل از ورود DNA فاژ λ به داخل *E.coli* این DNA خطی بوده و آویخته‌های تک-رشته‌ای در انتهاهای ′۵ دارد. به دنبال ایجاد عفونت، حلقوی‌سازی با هیبریدیزاسیون دو انتها به یکدیگر رخ می‌دهد. تولید پیوندهای فسفودی-استری بین انتهاهای ′۳ و ′۵ هر رشته توسط **DNA لیگاز** سبب تولید یک حلقه بسته کووالان می‌شود (شکل ۳۲-۲). رشته‌های یک DNA حلقوی نمی‌توانند به شکل برگشت-ناپذیری با دناتوراسیون از یکدیگر جدا شوند، زیرا به صورت حلقه‌های بسته درهم‌پیچیده[1] وجود دارند. عدم وجود انتهاهای ′۳ یا ′۵ سبب می‌شود تا DNA حلقوی نسبت به اگزو-نوکلئازها کاملاً مقاوم شده و طول عمر DNA آن افزایش یابد.

بیشتر DNA موجود در باکتری‌ها تنها به صورت حلقه‌های بسته وجود دارند. اینها شامل کروموزوم‌های باکتریایی و ملکول‌های DNA **پلاسمیدی** خارج کروموزومی هستند. ملکول‌های اخیر چندین هزار جفت باز طول دارند و ژن‌های کمکی برای کدنمودن مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارند. پلاسمیدها مستقل از DNA کروموزومی حفظ و همانندسازی می‌شوند و ممکن است تعداد آنها در یک باکتری به صدها عدد برسد. DNA حلقوی در موجودات عالی نیز وجود دارند. مخمرها نیز می‌توانند حاوی پلاسمیدهای حلقوی باشند. میتوکندری‌ها و کلروپلاست‌های موجود در سلول‌های اوکاریوتی عالی حاوی ملکول‌های DNA حلقوی به طول ۲۰۰-۱۵۰۰$\times10^3$ bp هستند که پروتئین‌های بی‌همتای مورد استفاده توسط این



شکل ۳۲-۲ حلقوی‌شدن DNA فاژ λ. DNA باکتریوفاژ λ به اشکال خطی و حلقوی وجود دارد که قابل تبدیل به یکدیگر هستند. حلقوی‌شدن DNA فاژ λ به این دلیل ممکن می‌باشد که آویخته‌های ′۵ شکل خطی، توالی‌های مکمل یکدیگر هستند.

1. Imtertwined

اندامک‌ها را کد می‌کنند (ص ۷۸۹). وجود یک ژنوم مستقل و یک تشابه برجسته با سیانوباکتری‌ها منجر به طرح این نظریه شده است که این اندامک‌ها میلیاردها سال قبل، از یک ارتباط درون‌همزیستی بین سلول‌های پروتواوکاریوتی و باکتری‌ها به‌وجود آمده‌اند.

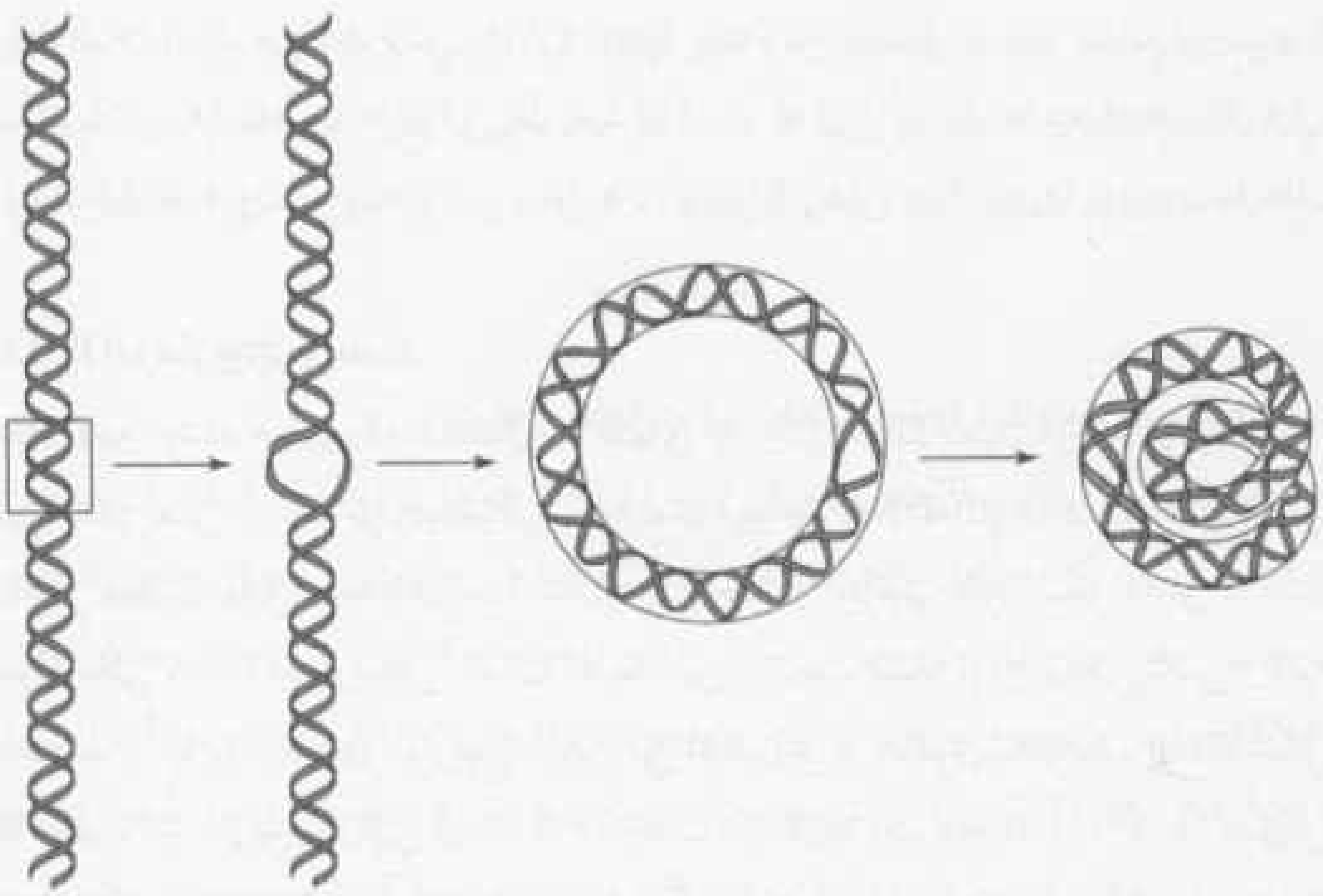
DNA ابرمارپیچی است

DNA دو-رشته حلقوی که با اتصال دو انتهای آزاد یک DNA خطی به‌وجود می‌آید، **شُل**[1] می‌باشد؛ یعنی، از نظر ترمودینامیکی ساختمان مساعد B-DNA را دارد. این DNA شُل کاهش فعالیت قابل توجه را در همانندسازی، ترجمه، و نوترکیبی دارد. شکل دارای فعالیت بیولوژیکی DNA **ابرمارپیچی**[2] است که یک ایزومر تحت فشار توپولوژیکی ناشی از کم-تاب‌شدن[3] یا پرتاب‌شدن[4] مارپیچ دوتایی می‌باشد. قبل از حلقوی‌شدن یک DNA شکل B خطی، این مارپیچ دوتایی در هر ۱۰٫۵ جفت باز تقریباً یک پیچ کامل دارد. در صورتی که قبل از حلقوی‌شدن، پیچ DNA باز شود[5]، ساختمان حاصل تحت فشار خواهد بود (شکل ۳۳-۲). بازشدن پیچ[6] سبب کاهش تعداد پیچ‌های مارپیچی موجود در ساختمان حلقوی می‌شود. کم‌تاب‌شدن مارپیچ را می‌توان از طریق برهم‌زدن جفت‌باز در یک ناحیه کوچک در جهت تولید یک جفت قوس تک-رشته در ساختمان حلقوی شُل تولید نمود. از دست‌رفتن تراکم‌پذیری بازی در این ساختمان از نظر انرژی نامساعد است. هرچند، در صورتی که تمامی تراکم‌پذیری بازی حفظ شود، کم‌تاب‌شدن سبب ایجاد یک فشار پیچشی[7] در اسکلت مارپیچ دوتایی می‌شود. پیچیدن کل DNA حلقوی در خلاف جهت چرخش ابتدایی، سبب رهایی این فشار می‌شود. این حالت همراه با ایجاد یک فنر فنری‌شده[8] می‌باشد که با نام ابرمارپیچ بهتر شناخته شده است. گفته می‌شود DNA کم‌تاب دارای ابرفنر منفی است و ابرمارپیچ حاصل راست‌گردان است (شکل ۳۴-۲). برعکس، DNA پرتاب از نوع ابرفنر مثبت است و یک ابرمارپیچ چپ-گردان تولید می‌کند.

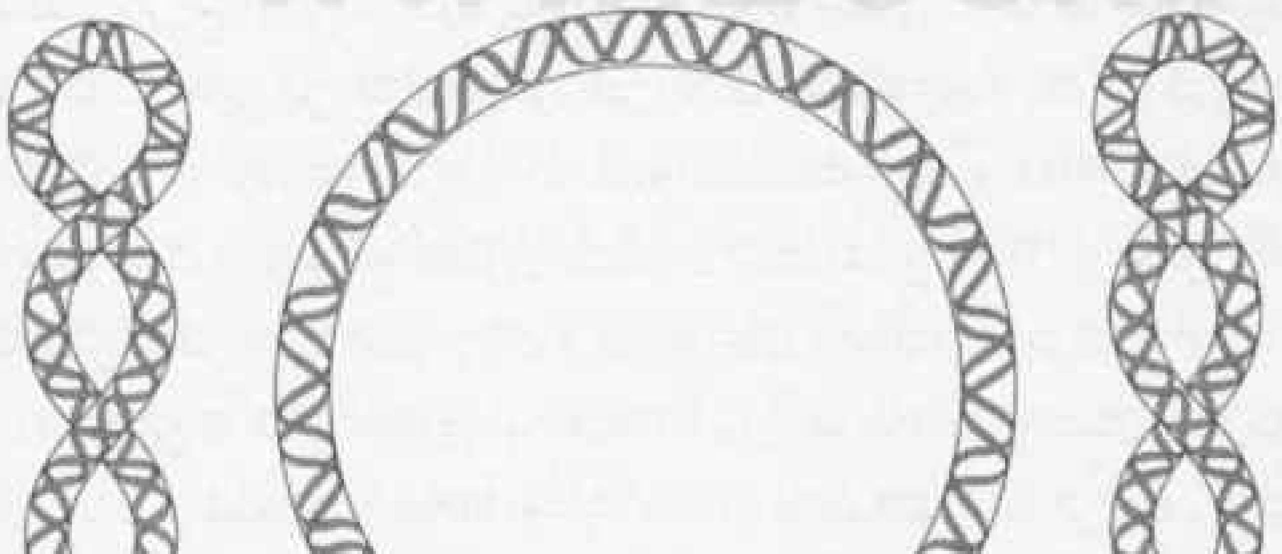
با وجود این‌که شکل حلقوی-بسته DNA برای کسب یک ساختمان ابرمارپیچی ایده‌آل است، هر قطعه‌ای از DNA دو-رشته که در هر دو انتها ثابت می‌باشد، می‌تواند ابرمارپیچی باشد. برای مثال، DNA سلول‌های اوکاریوتی می‌تواند شکل ابرمارپیچی اتخاذ کند زیرا با اتصال به پروتئین‌های هسته، دومن‌های توپولوژیکی بسته متعددی به‌وجود می‌آید. یک دومن توپولوژیکی به‌صورت یک قطعه DNAای تعریف می‌شود که مانع چرخش مارپیچ دوتایی می‌شود (شکل ۳۵-۲).

در مجموع، در DNA حلقوی یا خطی، به نظر می‌رسد وجود ابرمارپیچیت[9] منفی یک خصوصیت مهم است. ایجاد ابرفنر سبب تسریع در بسته‌بندی DNA در داخل محدوده سلولی از طریق تسهیل تشکیل ساختمان‌های متراکم می‌شود. ابرمارپیچ‌ها همچنین

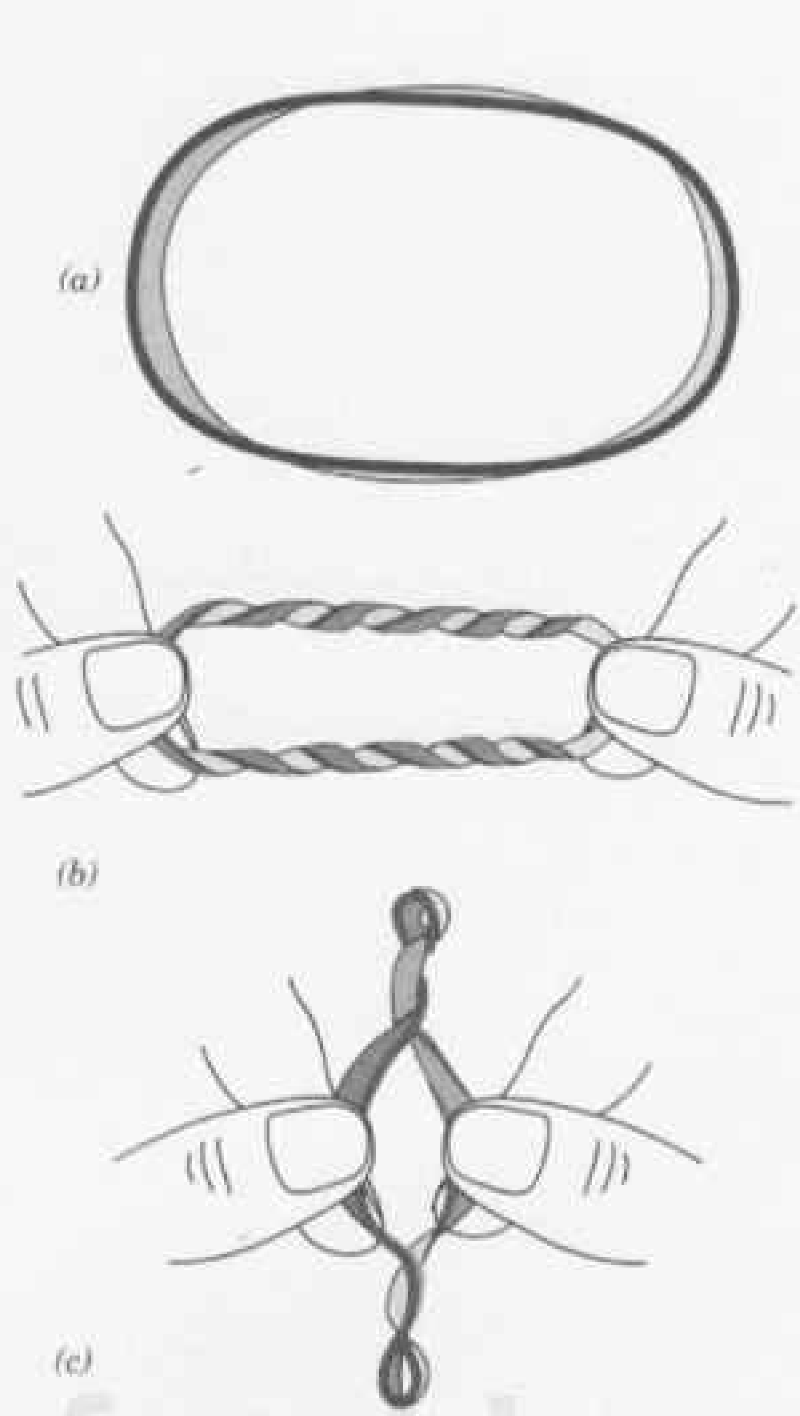
1. Relaxed
2. Superhelical
3. Underwinding
4. Overwinding
5. Untwisting
6. Turn
7. Torsional strain
8. Coiled coil
9. Superhelicity



شکل ۳۳-۲ ایجاد ابرفنر منفی DNA. ابرفنرهای راست‌گردان (DNA با ابرفنر منفی) در صورتی تولید می‌شوند که DNA شُل به‌طور نسبی باز شود. بازشدن ممکن است منجر به از بین رفتن پیوندهای هیدروژنی شود و یا ممکن است ابرفنرهای منفی تولید کند. ابرفنرهای منفی برای جبران افزایش فشار حاصل از تشکیل مجدد جفت‌های بازی از بین‌رفته، تولید می‌شوند.



شکل ۳۴-۲ DNA شُل و ابرفنری. DNA شُل‌شده می‌تواند به DNA ابرمارپیچی راست‌گردان یا چپ‌گردان تبدیل شود. DNA راست‌گردان (DNA با ابرفنر منفی) شکلی است که به‌طور طبیعی در سلول‌ها وجود دارد. DNA چپ‌گردان ممکن است به‌دلیل این‌که DNA در معرض تغییرات آنزیمی (همانندسازی، نوترکیبی و غیره) قرار دارد، به‌وجود آید و در برخی گونه‌های باکتری یافت می‌شود. در این شکل، الگوهای کاملاً متفاوت تاشدن راست‌گردان و چپ‌گردان مارپیچ‌های DNA به نمایش گذاشته شده‌اند.



شکل ۳۵-۲ مدل ابر مارپیچی برای DNA. با یک نوار لاستیکی می‌توان خصوصیات توپولوژیکی DNA حلقوی دو-رشته را نشان داد. (a) شکل شُل این نوار. (b) این نوار می‌تواند پیچیده و تولید دو دومن توپولوژیکی متفاوت کند که توسط جفت «گیره‌های انگشت شست - انگشت اشاره» جدا شده‌اند. پیچ‌های چپ‌گردان (خلاف عقربه‌های ساعت) در قسمت بالایی نوار همراه با پیچ‌های راست‌گردان (جهت عقربه‌های) در قسمت پایینی تشکیل می‌شوند. (c) وقتی این گیره‌ها در مجاورت یکدیگر قرار می‌گیرند، قسمت بالایی که حاوی پیچ‌های چپ-گردان است، تولید ابرمارپیچ راست‌گردان می‌کند. قسمت پایینی تولید ابرمارپیچ چپ-گردان می‌کند. ابرمارپیچیت از خصوصیات کل یک ملکول DNA نیست، بلکه خصوصیتی از دومن‌های اختصاصی موجود در DNA می‌باشد.

تمایل به ایجاد نواحی بدون پیوند هیدروژنی (حباب‌ها) دارند که ممکن است در تسهیل فرایند جداسازی موضعی رشته DNA طی ترمیم، سنتز و نوترکیبی DNA مفید باشد.

توپوایزومرازها

توپوایزومرازها تولید ابرمارپیچ‌ها را تنظیم می‌کنند. این آنزیم‌ها شکستن و اتصال مجدد هماهنگ رشته‌های DNA را کاتالیز نموده و تولید DNAای می‌کنند که نسبت به حالت ابتدایی، کم و بیش ابرمارپیچی است (جدول ۴-۲). تنظیم دقیق میزان سلولی ابرمارپیچیت DNA در تسهیل تعاملات پروتئینی با DNA مهم است. نسبت سلولی ATP به ADP ممکن است نقشی در این فرایند داشته باشد، زیرا بر روی فعالیت برخی توپوایزومرازها تأثیر می‌گذارد. ترکیباتی که توپوایزومرازها و ژیرازها را مهار می‌کنند، عوامل ضدباکتریایی و ضدتوموری مؤثری هستند (ارتباط بالینی ۷-۲).

توپوایزومرازهای I شکست‌های تک-رشته زودگذر را در یک مارپیچ دورشته DNA ابرفنری منفی به‌وجود می‌آورند؛ عبور رشته شکسته‌نشده از میان این شکاف سبب حذف

جدول ۴-۲ • خصوصیات DNA توپوایزومرازها

توپوایزومراز	نوع[1]	فعالیت
توپوایزومراز I *E.coli* (*topA*)[2]	IA	DNA ابرفنری منفی را شُل می‌کند
توپوایزومراز II *E.coli* (*topB*)	IA	DNA ابرفنری منفی را شُل می‌کند، فعالیت جداکردن کاتنان‌ها
توپوایزومراز III اوکاریوتی (*top3*)	IA	نقش احتمالی در نوترکیبی و یا جداکردن کروموزوم‌ها؟
DNA ژیراز معکوس آرکیایی	IA	ایجاد ابرفنرهای مثبت در DNA
DNA توپوایزومراز I اوکاریوتی (*top 1*)	IB	DNA ابرفنری منفی یا مثبت را شُل می‌کند
DNA توپوایزومراز I آبله گاوی (پاکس‌ویروس)	IB	DNA ابرفنری منفی یا مثبت را شُل می‌کند؛ به‌طور اختصاصی به‌توالی DNA ابرفنری متصل می‌شود
DNA ژیراز *E.coli* (*gyrA, gyrB*)	II	ایجاد ابرفنرهای منفی در DNA، DNA ابرفنری منفی یا مثبت را شُل می‌کند
توپوایزومراز IV *E.coli* (*par C, par E*)	II	جداسازی کروموزوم‌ها طی همانندسازی؛ DNA ابرفنری منفی را شُل می‌کند
DNA توپوایزومراز II اوکاریوتی (*top2*)	II	جداسازی کروموزوم‌های متصل؛ DNA ابرفنری منفی یا مثبت را شُل می‌کند

[1] توپوایزومرازهای نوع I از Mg^{2+} به‌عنوان یک کوفاکتور استفاده می‌کنند. ولی نیاز به ATP ندارند. توپوایزومرازهای نوع II نیاز به Mg^{2+} و ATP دارند.

[2] نام ژن کدکننده برای توپوایزومراز با حروف ایتالیک نشان داده شده‌اند.

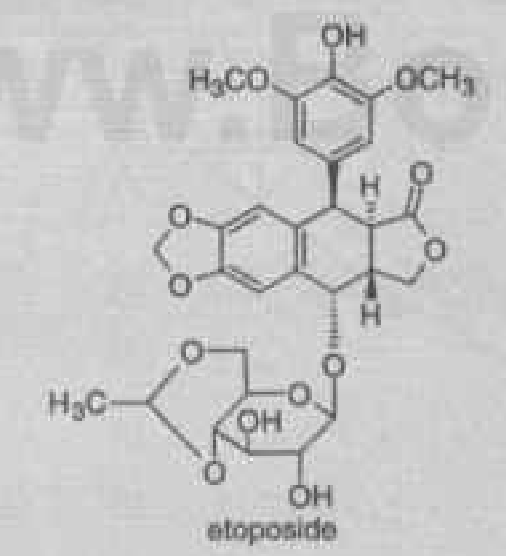
ارتباط بالینی ۷-۲

توپوایزومرازها در درمان بیماری

توپوایزمرازها اهداف مهمی برای عوامل ضدمیکروبی و ضدنئوپلاستیک هستند. این داروها همانند اکثر آنزیم‌های دارای هدف آنزیمی، مانع فعالیت کلی آنزیم نمی‌شوند. بلکه کمپلکس حدواسطی را بین توپوایزومراز و DNA بدام می‌اندازند. این اثر ممکن است منجر به تخریب DNA، ایجاد جهش یا مهار ترجمه و همانندسازی شود.

در درمان سرطان‌ها، هر دو توپوایزومراز I و II می‌توانند مورد هدف قرار گیرند. کامپتوتسین و مشتقات آن بر روی توپوایزومراز I عمل می‌کنند. یک ارتباط فوق‌العاده بین فعالیت ضدتوموری مشتقات مختلف کامپتوتسین بر روی لوسمی موشی و تداخل آنها با فعالیت توپوایزومرازی گزارش شده است. اینها ممکن است با تشکیل کمپلکس‌های شکست کووالان DNA که توسط دارو تثبیت می‌گردند، سبب ایجاد ضایعات کشنده بالقوه شوند. برای سمیّت سلولی ممکن است نیاز به همانندسازی بعدی DNA باشد. احتمال دارد کارایی مشتقات کامپتوتسین با افزایش مقادیر توپوایزومراز I در سلول‌های توموری نظیر سرطان‌های پیشرفته کولون افزایش یابد. دو عامل ضدنئوپلاستیک قوی دیگر، شامل آمساکرین و اتوپوزید، به‌طور انتخابی بر روی توپوایزومرازهای II اثر می‌کنند و نشان می‌دهند این داروها سبب تثبیت کمپلکس‌های شکست کووالان DNA توپوایزومراز II می‌شوند. شواهد غیرمستقیم مطرح می‌کنند که این داروها ممکن است تولید این کمپلکس‌ها را تحریک کنند. شکست‌های DNA به‌واسطه توپوایزومراز II می‌توانند اثرات سیتوتوکسیک خود را در غیاب سنتز در حال انجام DNA، احتمالاً از طریق القاء نوترکیبی و جهش در محل‌های تشکیل کمپلکس‌های DNA–توپوایزومراز II ناشی از دارو، به انجام برسانند. هدف بسیاری از عوامل ضدسرطان، شامل آنتراسیکلین‌ها[1] (از جمله آدریامایسین[2] و دوکسوروبیسین[3])، اینترکالیتورهای سنتتیک، الیپتیسین‌ها[4]، و پودوفیلاتوکسین‌ها[5] نیز توپوایزومرازهای II است. نئوپلاسم‌های هماتولوژیک، نظیر لوسمی‌های لنفوئیدی و غیرلنفوئیدی، لنفوم‌های غیرهوجکینی درجه‌–بالا، و بیماری هوجکین، بیشتر با ترکیبی از مهارکننده‌های توپوایزومراز II همراه با یا بدون عوامل سیتوتوکسیک دیگر درمان می‌شوند.

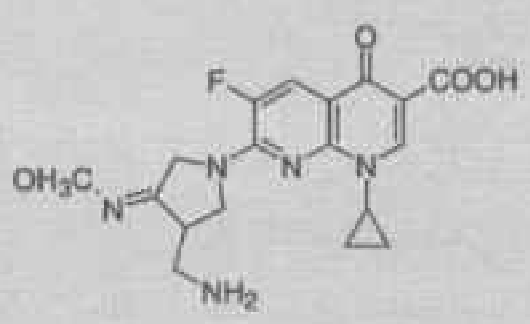
سیپروفلوکساسین ($Cipro^R$) برای استفاده در درمان سیاه‌زخم تنفسی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. این عامل از انواع کینولون‌هایی است که کلاسی از عوامل دارای فعالیت ضدباکتریایی با طیف وسیع قوی می‌باشند. این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور انتخابی DNA ژیراز باکتریایی و توپوایزومراز IV باکتریایی را مهار می‌کنند. کینولون‌ها به کمپلکس‌هایی اتصال می‌یابند که توسط این آنزیم‌ها ایجاد شده و سبب مهار همانندسازی DNA می‌شوند. نهایتاً، مرگ سلولی به دلیل تجمع شکست‌های کشنده دو–رشته در DNA باکتریایی رخ می‌دهد. از آنجایی‌که این آنزیم‌ها در سلول‌های اوکاریوتی یافت نمی‌شوند، داروهای کینولونی شدیداً از نظر عمل سیتوتوکسیک انتخابی هستند. فلوروکینولون‌هایی نظیر سیپروفولوکساسین فعالیت خوبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان می‌دهند، در حالی‌که داروهای جدیدتر حتی فعالیت‌های وسیع‌تری را نشان می‌دهند. برای مثال، ژمی‌فلوکساسین (FactiveR) به‌خصوص برای درمان عفونت‌های تنفسی، شامل انواع حاصل از Staphylococcus pneumoniae[6] با مقاومت چند–دارویی، *Mycoplasma* و *Legionella*، مفید است.



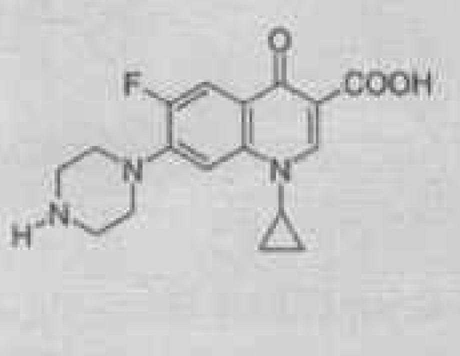
etoposide



camptothecin



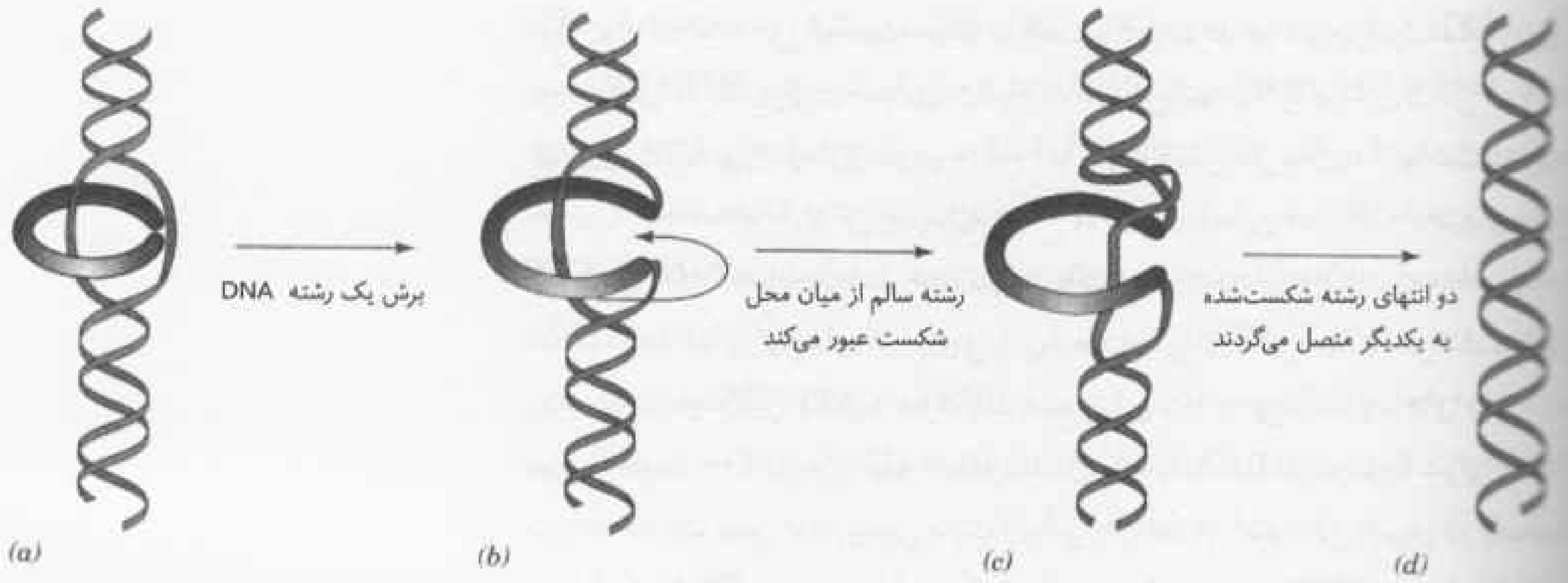
gemifloxacin



ciprofloxacin

1. Anthracyclines 2. Adriamycin 3. Doxorubicin 4. Ellipticines
5. Pdophyllotoxins

۶. به‌نظر می‌رسد *Strptococcuspneumoniae* صحیح است. مترجم



شکل ۳۶-۲   **مکانیسم عمل توپوایزومرازهای I.** توپوایزومرازهای I از طریق (a) اتصال و جداسازی موضعی رشته‌های مکمل؛ سپس (b) ایجاد برش در یک رشته و اتصال به دو انتهای تازه تولید؛ و (c) عبور رشته سالم از میان شکاف حاصل از برش و بستن شکاف از طریق ایجاد پیوند فسفودی استری، DNA را شُل می‌کنند. نتیجه یک ساختمان شُل‌شده (d) می‌باشد.

یک ابرفنر از DNA می‌شود (شکل ۳۶-۲). طی این واکنش، آنزیم از طریق یک اتصال کووالان بین یک ریشه تیروزیل و یک گروه فسفریل موجود در جایگاه برش، متصل به DNA باقی می‌ماند. بدین‌ترتیب انرژی حاصل از شکستن پیوند فسفودی‌استری برای ترمیم بعدی این برش حفظ می‌شود. دو کلاس توپوایزومراز I از نظر تشکیل پیوندهای ۵′-فسفوتیروزین (کلاس IA) یا ۳′-فسفوتیروزین (کلاس IB) با یکدیگر اختلاف دارند.

توپوایزومرازهای II پروتئین‌های دیمری هستند که به DNA مارپیچی-دوتایی اتصال می‌یابند و هر دو رشته را می‌شکنند (شکل ۳۷-۲). عبور قطعه DNA مارپیچی-دوتایی



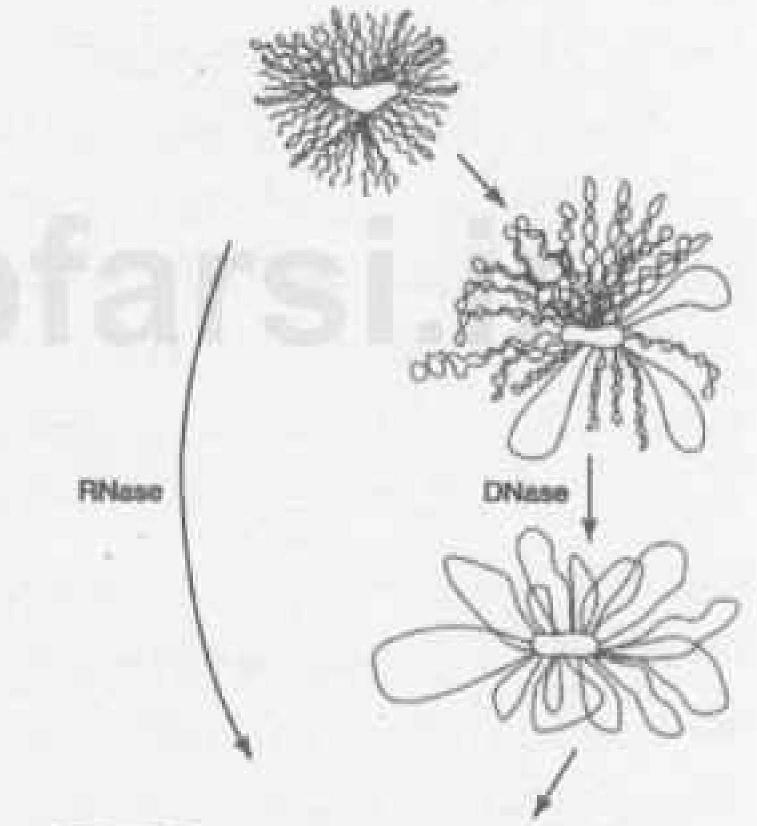
شکل ۳۷-۲   **مکانیسم عمل توپوایزومرازها II.** توپوایزمرازهای نوع II قادر به شُل نمودن یا، در مورد ژیرازها، تولید ماریبچ‌های منفی در داخل DNA هستند. مکانیسم عمل ژیراز با استفاده از تبدیل یک شکل DNA شُل‌شده به یک ملکول حاوی ابتدا دو ابرفنر، یکی مثبت و یک منفی (مرحله ۱)، شرح داده می‌شود. عبور یک قطعه DNA از میان ابرفنر مثبت نشان داده‌شده در قسمت راست شکل (مرحله ۳) همراه با تولید ملکولی با دو ابرفنر منفی است. این واکنش نیاز به هیدرولیز ATP به‌عنوان یک منبع انرژی دارد.

دیگر از میان این محل شکست سبب برداشت یا افزودن دو ابر فنر می‌شود. تمامی توپو-ایزومرازهای II اوکاریوتی و بسیاری از انواع پروکاریوتی تنها DNA ابرفنری را شُل می‌کنند. هیدرولیز ATP برای نوسازی آنزیم، و نه واقعاً برای واکنش شُل‌سازی، لازم است. **ژیرازها** به‌عنوان زیرمجموعه‌ای از توپوایزومرازهای نوع II تنها آنزیم‌هایی هستند که ابرفنرهای منفی را به داخل DNA اضافه می‌کنند. اینها تنها در باکتری‌ها وجود دارند؛ اوکاریوت‌ها از پیچیدن DNA در اطراف پروتئین‌های کروموزومی برای ایجاد ابرفنرهای منفی استفاده می‌کنند. واکنش ژیراز نیاز به هیدرولیز ATP به‌عنوان یک منبع انرژی دارد و می‌تواند ابرفنرهای منفی را با سرعت حدود ۱۰۰ در هر دقیقه اضافه کند. ژیرازها به DNA در کونفورماسیونی اتصال می‌یابند که یک قوس ابرمارپیچی مثبت و منفی را ایجاد می‌کنند، ولی تغییری در وضعیت توپولوژیکی DNA به‌وجود نمی‌آورند. شکست دو-رشته و عبور DNA از میان این شکاف همراه با تولید دو ابرفنر منفی است.

توپوایزومرازها همچنین سایر ایزومریزاسیون‌های توپولوژیکی را کاتالیز می‌کنند. توپو-ایزومرازهای باکتریایی نوع III دارای خصوصیات توپوایزومراز نوع I هستند؛ یعنی، ابرفنرها را بدون نیاز به یک منبع انرژی، نظیر هیدرولیز ATP، شُل می‌کنند. این توپوایزومرازها ممکن است در تفکیک محصولات DNA حلقوی درهم‌قفل‌شده (کاتنات‌ها[1]) تولیدی در زمان درست قبل از تکمیل همانندسازی DNA تخصص داشته باشند. ژیرازهای معکوس به‌عنوان اعضاء یک کلاس غیرمعمول توپوایزومرازها، برای اولین بار از آرکی‌باکتری‌ها جدا شدند. این ژیرازها ابرفنرهای مثبت را به‌داخل DNA ارائه می‌دهند که ممکن است سبب محافظت آنها در برابر شرایط دناتوره‌کننده درجه حرارت و اسیدیته بالایی شوند که این باکتری‌ها در آن وجود دارند.

بسته‌بندی DNA پروکاریوتی

در سلول‌های پروکاریوتی، تک کروموزوم موجود یک DNA حلقوی دو-رشته ابرفنری است. کروموزوم‌های باکتریایی ساختمان‌های پویایی هستند که نیاز به سنتز DNA، تقسیم سلولی، و رونویسی سریع را منعکس می‌کنند. هر چند، در یک باکتری معمول نظیر ***E.coli*** طول محوری DNA حدود ۷۵۰ برابر بزرگتر از طول سلول است. لذا DNA می‌بایست به یک شکل کاملاً متراکم بسته‌بندی شود تا در داخل سلول جای گیرد. کروموزوم‌های باکتریایی از طریق تعامل با پروتئین‌های **HU** و **H-NS** و همکاری کاتیون‌ها، پلی‌آمین‌ها (نظیر اسپرمین، اسپرمیدین، پوترسین و کاداورین)، RNA و پروتئین‌های غیرهیستونی مختلف، به صورت ساختمان‌های متراکمی، به نام **نوکلوئید**، سازماندهی می‌شوند (شکل ۳۸-۲). HU یک هترودیمر 18 kDa با دو زیرواحد تقریباً یکسان (HU-1 و HU-2) می‌باشد. به دنبال اتصال، HU سبب تغییر شکل و حالت ابرفنری DNA می‌شود. اتصال HU در آزمایشگاه سبب



شکل ۳۸-۲ کروموزوم‌های باکتریایی در نوکلوئیدها بسته‌بندی می‌شوند. کروموزوم‌های حلقوی یک باکتری به‌صورت ۴۰ تا ۵۰ قوس از DNA ابرفنری متراکم می‌شود که توسط یک داربست پروتئین- RNA مرکزی سازماندهی شده‌اند. DNase به‌صورت پیشرونده با بازنمودن قوس‌های مجزا، یکی در هر زمان، این ساختمان را شُل می‌کند. RNase با از بین بردن هسته نوکلوئید، کروموزوم را در یک مرحله باز می‌کند.

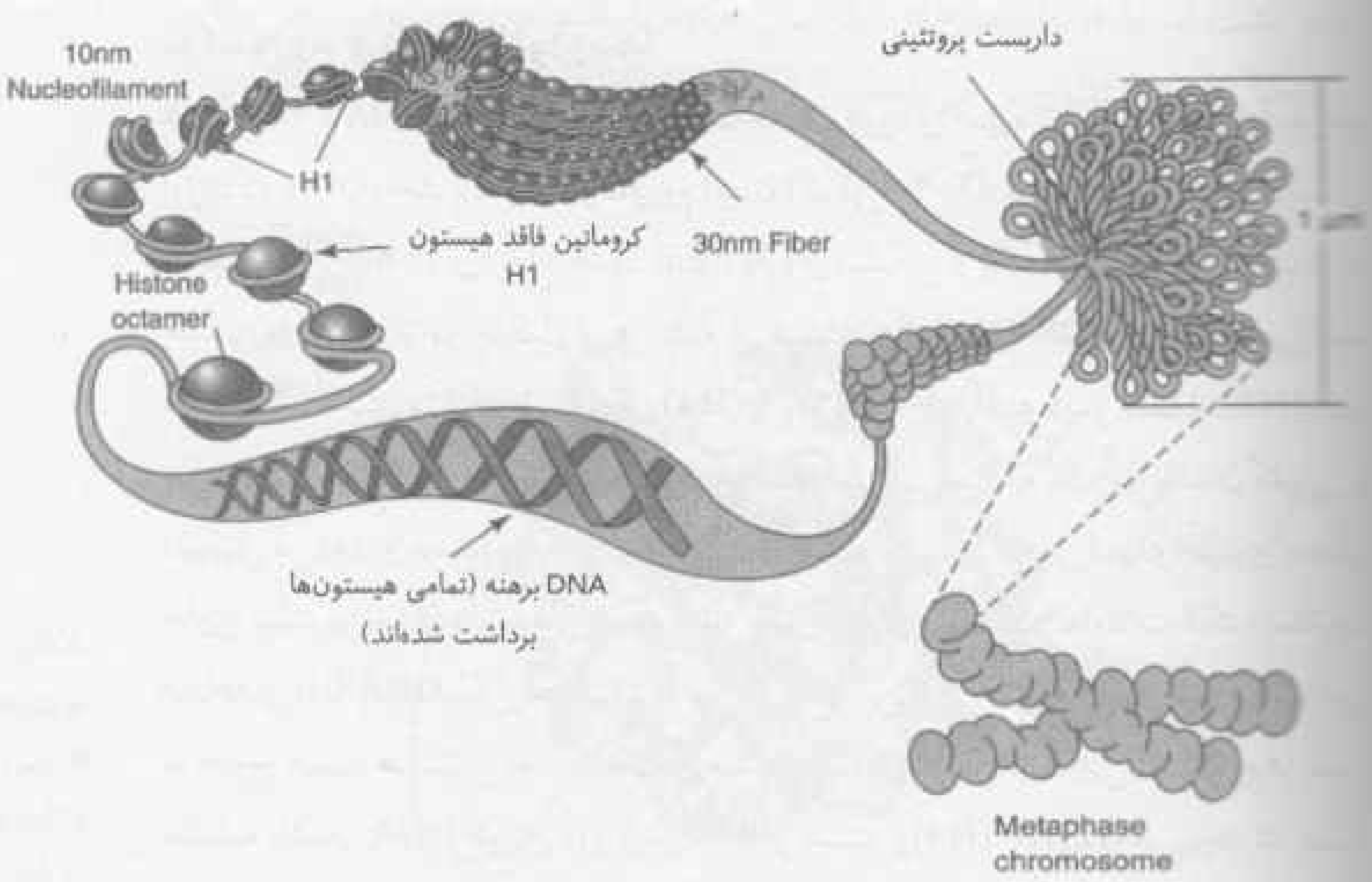
1. Catenates

تراکم DNA و محدودیت ابرفنرها به طریق وابسته به غلظت می‌شود. در یک نسبت اکی‌مولار، تعامل DNA با HU مانع شل‌نمودن DNA ابرفنری منفی در کمپلکس DNA-HU توسط توپوایزومرازهای I می‌شود. غلظت‌های بالاتر HU سبب افزودن ابرفنرهای بیشتر نمی‌شود. به‌نظر می‌رسد، HU سبب می‌شود تا DNA به صورت یک حلقه فشرده تا شود و اساساً مسئول تولید یک ساختمان نوکلوئیدی مهره‌دار[1] می‌باشد. در نوکلوئید، یک ملکول DNA ابرفنری به صورت تقریباً ۴۰ قوس سازماندهی می‌شود که اندازه هر کدام حدود 10^5 bp است که به داخل یک داربست غنی از پروتئین و RNA فرو می‌رود. RNA نقش بی‌همتایی در بسته‌بندی کروموزوم در پروکاریوت‌ها دارد. در نتیجه تولید یک نوکلوئید، ژنوم باکتریایی می‌تواند براحتی در داخل یک سلول جای گیرد.

سازماندهی کروماتین اوکاریوتی

طول بسیار بزرگ ژنوم اکثر اوکاریوت‌ها، تقسیم اطلاعات ژنتیکی در چندین کروموزوم مستقل را ضروری می‌سازد. سلول‌های انسانی ۲۳ جفت کروموزوم با طول متوسط 1.3×10^8 bp یا حدود ۴۳ mm دارند. هر کروموزوم متشکل از یک ملکول DNA با اندازه متفاوت از 263×10^6 bp برای کروموزوم ۱ تا کمتر از 50×10^6 bp برای کروموزوم Y می‌باشد. برای این که این میزان DNA در داخل هسته سلولی به قطر حدود ۱۰–۲۰ μm جای گیرد، نیاز به نسبت تراکم با پنج درجه بزرگی (10^5) می‌باشد (شکل ۳۹–۲).

DNA موجود در سلول‌های اوکاریوتی همراه با پروتئین‌های مختلفی است که مجموعاً کروماتین را به‌وجود می‌آورند. در سلول‌هایی که در حال تقسیم نیستند (اینترفاز)، کروماتین



شکل ۳۹–۲ سازماندهی DNA به‌صورت کروموزوم. نمایشی که متراکم‌شدن مرحله به مرحله DNA به کروماتین را نشان می‌دهد. در ابتدا DNA در اطراف هیستون‌های هسته نوکلئوزومی می‌پیچد، متراکم‌شدن با هیستون H1 همراه با تولید نوکلئوفیلمان ۱۰ نانومتری است که در ادامه به شکل یک ساختمان پیچیده قوس‌دارشده متصل به یک داربست پروتئینی در داخل کروموزوم بسته‌بندی می‌شود.

1. Beaded nucleoid structure

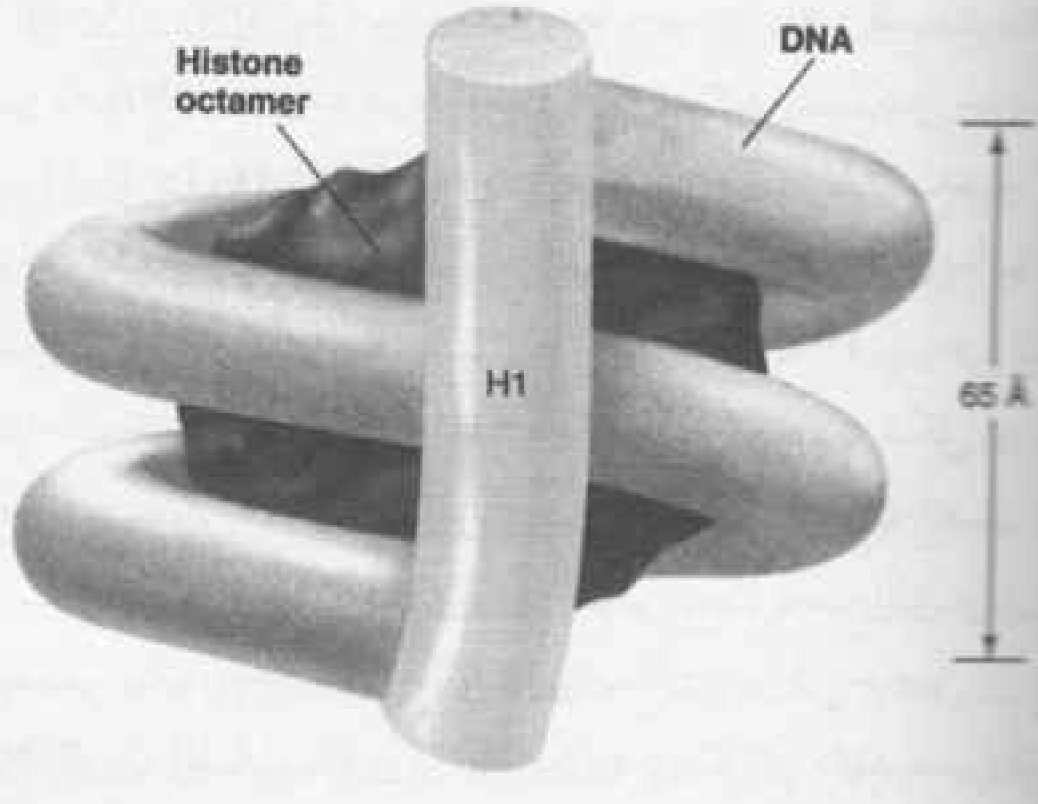
بی‌شکل بوده و در سرتاسر هسته متفرق می‌باشد. درست قبل از تقسیم (متافاز)، این کروماتین به صورت ساختمان‌های شدیداً متراکمی به‌نام **کروموزوم** متراکم می‌شود. هر کروموزوم با یک سانترومر مشخص می‌شود که محل اتصال پروتئین‌هایی است که کروموزوم را به دوک میتوتیک متصل می‌کنند. **تلومرها** دو انتهای کرموزوم‌های خطی هستند. کروموزوم‌ها همچنین حاوی توالی‌های مورد نیاز برای شروع همانندسازی DNA (**مبداء همانندسازی**) هستند.

هیستون‌ها فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در کروماتین هستند. پنج کلاس از این پروتئین‌ها وجود دارند :**هیستون‌های H1، H2A، H2B، H3** و **H4**. به دلیل محتوای غیرمعمول بالای اسیدهای آمینه بازی لیزین و آرژنین، هیستون‌ها شدیداً کاتیونی هستند و با اسکلت فسفات پلی‌آنیونی DNA تعامل نموده تا نوکلئوپروتئین‌های بدون بار را تولید کنند. توالی-های آمینو اسیدی هیستون‌ها شدیداً بین گونه‌ها حفظ شده هستند. با وجود این که گونه‌های نخود و گاو بیش از یک میلیارد سال قبل از یکدیگر جدا شده‌اند، هیستون‌های **H1** مربوط به آنها تنها از نظر دو اسید آمینه با یکدیگر اختلاف دارند. هیستون‌های **H3** نیز شدیداً حفظ‌شده هستند، ولی نواحی غیربازی هیستون‌های **H2A** و **H2B** کمتر حفظ‌شده می‌باشند. H1 بزرگتر و بازی‌تر است و بیشترین ویژگی بافتی و ویژگی گونه را دارد. در برخی انواع سلول‌های مهره‌داران، هیستون ششم H5 وجود دارد که به‌عنوان جایگزین **H1** عمل می‌کند. یک گروه ناهمگن از پروتئین‌ها با ویژگی بالای گونه و عضو، نیز در کروماتین وجود دارد. این پروتئین‌های غیرهیستونی متشکل از چندصد عضو هستند که بیشترین آنها به مقادیر ناچیز وجود دارند. بسیاری از اینها با فعالیت‌های کروموزومی نظیر همانندسازی، بیان ژن و سازماندهی کروموزوم در ارتباط هستند.

نوکلئوزوم و پلی‌نوکلئوزوم‌ها

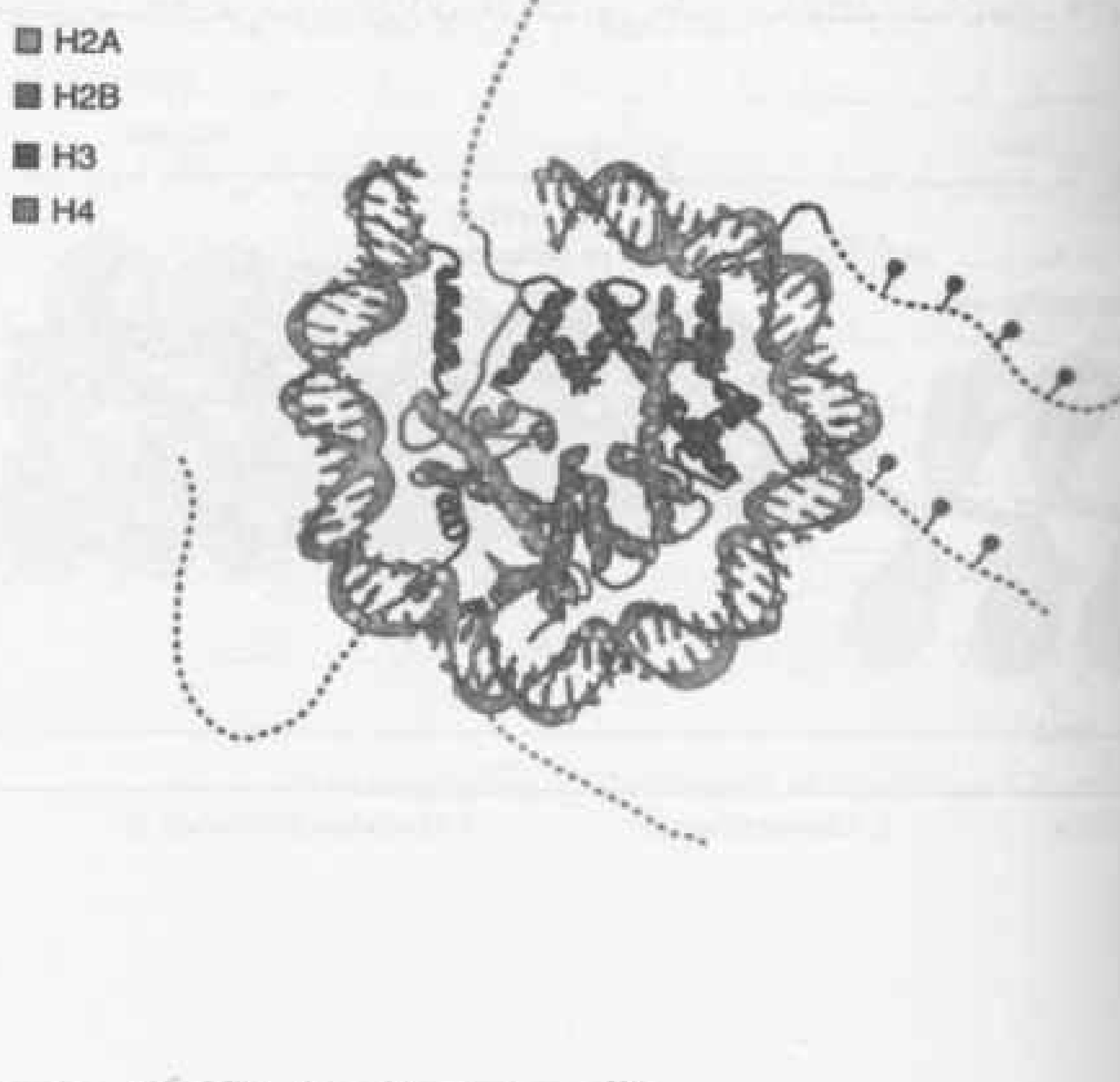
هیستون‌ها با DNA تعامل نموده تا یک ساختمان دوره‌ای «مهره بر روی رشته[1]» را به‌وجود آورند که در آن واحد پایه یک **نوکلئوزوم** است (شکل ۴۰-۲). هر نوکلئوزوم شکل دیسکی با قطر حدود ۱۱ nm و ارتفاع حدود ۶ nm دارد و متشکل از یک قطعه DNA و یک دسته هیستون متشکل از دو ملکول از هر کدام از هیستون‌های **H2A، H2B، H3** و **H4** می‌باشد. هر دسته اکتامری متشکل از تترامر $(H3)_2-(H4)_2$ به همراه دو دیمر H2A-H2B است. هر هیستون با یک دومن غیرقطبی مرکزی مشخص می‌شود که یک ساختمان گلبولی را تشکیل می‌دهد و مسئول تعاملات هیستون- هیستون است. نواحی انتهای آمینوی مجاور حاوی بیشترین میزان ریشه‌های اسید آمینه با بار مثبت هستند که تعاملات الکترواستاتیک مساعدی را با DNA برقرار می‌کنند. به‌نظر می‌رسد این توالی‌های دمی به صورت شعاعی به خارج هسته هیستونی امتداد یافته و ممکن است در تعاملات بین نوکلئوزوم‌ها نقش داشته باشند. DNA طوری دور این اکتامر هسته $(H3)_2-(H4)_2$ می‌پیچد که هسته

1. Beads on a string



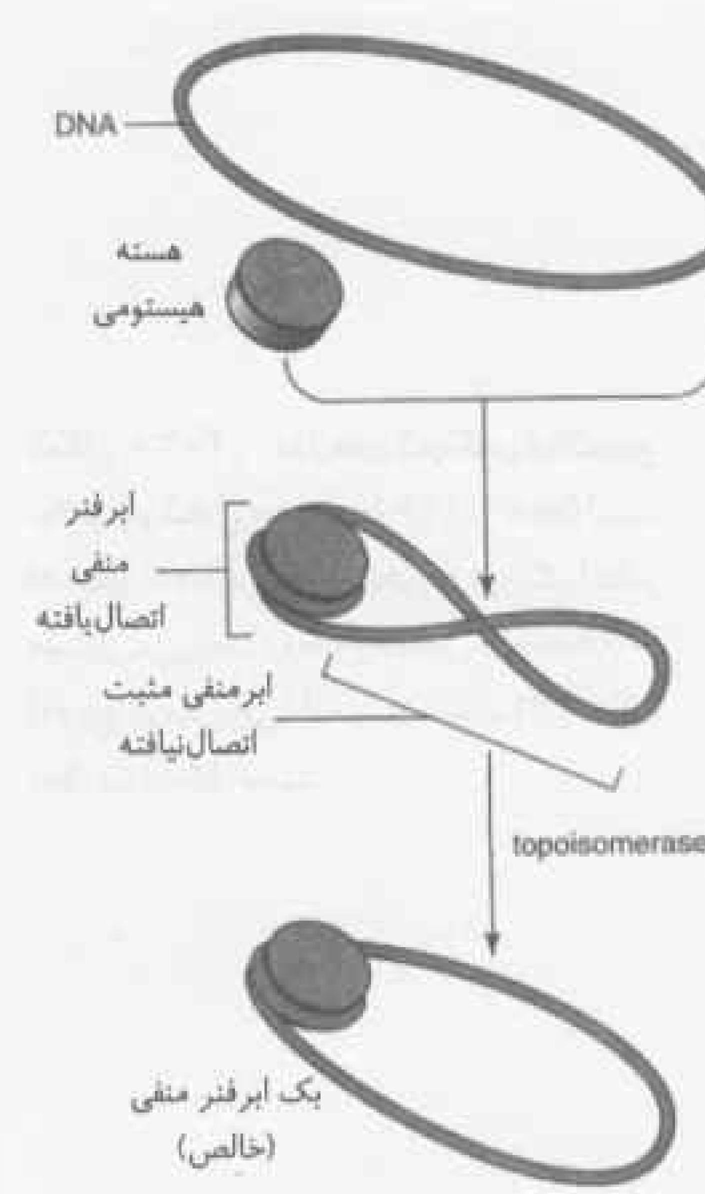
شکل ۴۰-۲ مدل‌های کمپلکس نوکلئوزوم. نوکلئوزوم شامل حدود ۱۴۶ bp از DNA است که حدود ۱٫۷۵ پیچ ابرمارپیچی به دور یک اکتامر هیستونی می‌پیچد. کروماتوزوم شامل حدود ۱۶۶ bp (دوپیچ ابرمارپیچی) است. هیستون H1 با DNA رابط در ارتباط است.

$(H3)_2-(H4)_2$ با ۸۰-۷۰ جفت باز از DNA احاطه‌کننده در تعامل می‌باشد (شکل-۴۱-۲). حدود ۱۴۶ bp از DNA دور اکتامر هیستونی می‌پیچد. هیستون‌ها در تماس با شیار کوچک DNA هستند و شیار بزرگ را برای تعامل با پروتئین‌های تنظیم‌کننده بیان ژن و سایر فعالیت‌های DNA باقی می‌گذارند. ساختمان هسته نوکلئوزومی تشریح می‌کند که چرا سلول‌های اوکاریوتی فاقد ژیرازهایی هستند که قادر به کم‌تاب‌نمودن DNA شُل هستند. به دلیل ایجاد یک فنر در اطراف هسته هیستونی (شکل ۴۲-۲)، ابرمارپیچ منفی بوجود می‌آید. این نوع پیچیدن همراه با برداشت یک پیچ مارپیچی از DNA می‌باشد که نتیجه آن تولید ابرفنر منفی در داخل ناحیه پیچیده‌شده در اطراف هسته هیستونی و ایجاد یک ابرفنر مثبت جبرانی در محل دیگری از این ملکول می‌باشد. شُل شدن بعدی این ابرفنر مثبت توسط توپوایزومرازهای اوکاریوتی همراه با باقیماندن یک ابرفنر منفی خالص در داخل ناحیه نوکلئوزومی می‌باشد.



شکل ۴۱-۲ ساختمان اشعه-X هسته نوکلئوزومی. صفحه هسته نوکلئوزومی به دو نیم تقسیم شده است تا یک پیچ DNA در اطراف چهار ملکول هیستونی را نشان دهد. خطوط مقطع اشاره به قسمت‌های غیرساختمانی دم‌های هیستونی دارند.

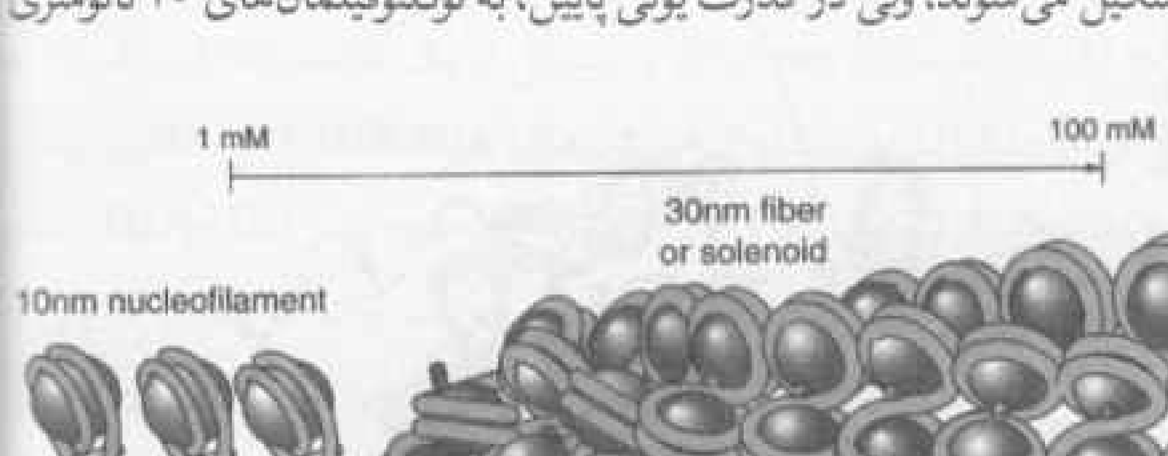
حدود ۲۰ تا ۹۰ bp از **DNA رابط** [1] بین نوکلئوزوم‌ها وجود دارد. این قسمت متصل به هیستون H1 است که DNA فنری‌شده را در محل قفل می‌کند؛ کمپلکس حاصل یک **کروموماتوزوم** [2] است (شکل ۴۰-۲). تکرار دوره‌ای توزیع نوکلئوزومی در طول ساختمان پلی-نوکلئوزوم با هضم کنترل‌شده توسط یک آندونوکلئاز تعیین شده است که ترجیحاً به DNA رابط حمله می‌کند. این توزیع نوکلئوزوم‌ها نسبت به توالی بازی DNA تصادفی نیست. DNA به‌طور یکنواخت خم نمی‌شود، بلکه ابتدا به ملایمت و سپس به شکل شدیدتری در اطراف اکتامرهای هیستونی تا می‌شود. این موضوع مطرح می‌کند که اتصال DNA وابسته به توالی است و این که موقعیت نوکلئوزوم‌ها ممکن است تحت تأثیر توالی DNA قرار گیرد. در حقیقت، نوکلئوزوم‌ها تمایل دارند تا ترجیحاً در نواحی حاصل از DNA تشکیل شوند. DNAای که قطعات بلندی از A یا تکرارهای G-C را دارند معمولاً تشکیل نوکلئوزوم نمی‌دهند. برعکس، برخی نواحی خمیده DNA، برای نمونه، قطعات دوره‌ای فاز A [3] قویاً به هیستون‌ها می‌پیوندند. اکتامرهای هیستونی می‌توانند در طول رشته DNA حرکت کنند. این حرکت امکان دسترسی پلیمرازها و سایر پروتئین‌های مورد نیاز برای رونویسی و همانندسازی به DNA را فراهم می‌سازد.



شکل ۴۲-۲ تولید ابرفنر منفی در DNA اوکاریوتی. اتصال یک اکتامر هیستونی به یک DNA دومن - بسته منجر به پیچیدن DNA در اطراف اکتامر و تولید یک ابر فنر منفی می‌شود. در غیاب هر نوع شکست رشته، این دومن سالم باقی مانده و یک ابرفنر مثبت جبرانی می‌بایست در محل دیگری در داخل این دومن به‌وجود آید. در ادامه با فعالیت توپوایزومراز اوکاریوتی این ابرفنری مثبت شُل شده و دومن بسته با یک ابرفنر منفی باقی می‌ماند.

بسته‌بندی پلی‌نوکلئوزوم به ساختمان‌های بالاتر

پیچیدن DNA به دور هیستون‌ها برای تولید نوکلئوزوم‌ها منجر به کاهش ۱۰ برابری طول ظاهری DNA و تولید یک **نوکلئوفیلمان ۱۰ نانومتری** می‌شود. متراکم‌شدن نوکلئوفیلمان‌های ۱۰ نانومتری به یک آرایش **سولنوئیدی** با همکاری شش تا هفت کروماتوزوم در هر دور همراه با تولید **فیبرهای ۳۰ نانومتری** است (شکل ۴۳-۲). ملکول‌های هیستون H1 به‌صورت تعاونی بیکدیگر متصل شده و نوکلئوزوم‌ها را در فیبرهای ۳۰ نانومتری به یکدیگر نزدیکتر می‌کنند. در غلظت‌های فیزیولوژیکی نمک، فیبرهای ۳۰ نانومتری به‌طور خودبه‌خودی تشکیل می‌شوند، ولی در قدرت یونی پایین، به نوکلئوفیلمان‌های ۱۰ نانومتری



شکل ۴۳-۲ ساختمان نوکلئوفیلمان. هیستون H1 متصل به نواحی رابط بین نوکلئوزوم‌ها منجر به متراکم‌شدن آنها به شکل فیبرهای ۱۰ نانومتری می‌شود. در قدرت‌های یونی بالا، نوکلئوفیلمان تولید ساختمان مارپیچی شدیداً متراکم یا یک سولنوئید مارپیچی می‌کند. در این ساختمان، هیستون‌های H1 در تعامل قوی با یکدیگر هستند.

1. Liker DNA 2. Chromatosome 3. Periodically phased A

تفکیک می‌شوند. تولید پلی‌نوکلئوزوم‌ها و متراکم‌شدن آنها به فیبرهای ۳۰ نانومتری، یک نسبت تراکم تا دو درجه بزرگی (10^2) را برای DNA به‌وجود می‌آورد. فیبرهای ۳۰ نانومتری تنها در نواحی انتخابی DNA تشکیل می‌شوند که با عدم اتصال به سایر پروتئین‌های غیر-اختصاصی توالی - اختصاصی مشخص می‌گردند. وجود اینها و اثرات آنها بر روی تولید فیبرهای ۳۰ نانومتری ممکن است بستگی به وضعیت رونویسی نواحی DNA درگیر داشته باشد.

مدل‌های مربوط به سطوح بالاتر تراکم‌پذیری فیبرهای ۳۰ نانومتری متکی بر شواهد غیرمستقیم حاصل از کروموزوم‌های lampbrush[1] اووسیت‌های مهره‌داران و کروموزوم‌های پلی‌تن سلول‌های بزرگ ترشحی[2] مگس میوه می‌باشند. این کروموزوم‌ها از این نظر استثناء هستند که در اینترفاز، یعنی زمانی‌که سلول‌ها در حال استراحت هستند (تقسیم نمی‌شوند)، ساختمان‌های سطوح بالاتر دقیقاً مشخصی راحفظ می‌کنند. به‌طور غیرمستقیم، خصوصیات ساختمانی کروموزوم‌های اینترفاز lampbrush منجر به این نظریه شده است که کروموزوم‌ها عموماً به صورت مجموعه‌هایی از دومن‌های قوس‌دار، متراکم‌شده فیبرهای ۳۰ نانومتری با اندازه مختلف برای ارگانیسم‌های متفاوت سازماندهی می‌شوند. این قوس‌ها ممکن است حاوی ۵۰۰۰ تا bp ۱۲۰۰۰۰ یا به‌طور متوسط حدود bp ۲۰۰۰۰ باشند. لذا ژنوم هاپلوئید انسانی حاوی حدود ۶۰۰۰۰ قوس خواهد بود. یک قوس ممکن است چند ژن مرتبط داشته باشد. قوس‌ها به یک داربست پروتئینی متشکل از هیستون H1 و چندین پروتئین غیرهیستونی، شامل دو پروتئین داربستی اصلی، Sc1 (یک توپوایزومراز II) و Sc2، اتصال دارند. این قوس‌ها در بازهای خود ثابت‌شده هستند و بنابراین می‌توانند ابرفنرها را جمع کنند. نواحی اختصاصی غنی از AT که تحت عنوان نواحی اتصال داربست[3] (SARs) شناخته‌شده می‌باشند، ترجیحاً با این داربست ارتباط دارند. SARها همچنین حاوی جایگاه‌های اتصالی توپوازومراز II هستند. وجود توپوایزومرازها مطرح می‌کند که این تغییرات در ایجاد ابرفنر در داخل این دومن‌ها از نظر بیولوژیکی مهم هستند. تولید دومن‌های قوس‌دار ممکن است مسئول یک تراکم ۲۰۰ برابر دیگر در طول DNA و یک نسبت بسته‌بندی کلی بیش از چهار درجه بزرگی (10^4) باشد. هر قوس می‌تواند فنری شده و بعداً می‌تواند به صورت ۰٫۴μm از یک فیبر ۳۰ نانومتری ابرفنر شود. از آنجایی‌که کروموزوم حدود ۱μm قطر دارد، بسته‌بندی فیبر ۳۰ نانومتری به یک کروماتید تنها نیاز به یک درجه بیشتر تاشدن خواهد داشت. بسته‌بندی بیشتر ممکن است با آرایش قوس‌های فیبر ۳۰ نانومتری به صورت فنرهای مارپیچی شدیداً متراکم حاصل شود. **کروماتیدها**، دو بازوی متصل از DNA همانندسازی شده در کروموزوم‌های شدیداً متراکم متافازی، ممکن است حاوی قوس‌هایی با بسته‌بندی مارپیچی فیبرهای ۳۰ نانومتری باشند.

---

1. شکل خاصی از کروموزوم‌هایی که در اووسیت‌های در حال رشد یافت می‌شوند.
2. Giant secretory cells 3. Scaffold attachment regions

به‌نظر می‌رسد تغییرات بسته‌بندی در مراحل مختلف چرخه سلولی، تا حدودی توسط تغییرات کووالان هیستون‌های مرکزی (**بازسازی هیستونی**[1]) کنترل می‌شوند. استیلاسیون برگشت‌پذیر بر روی گروه‌های ε-آمینوی لیزین و فسفریلاسیون ریشه‌های سرین و ترئونین در تنظیم فعالیت DNA نوکلئوزومی نقش دارند. این تغییرات سبب کاهش تعداد بارهای مثبت بر روی هیستون‌ها می‌شوند که نتیجه آن اتصال سُست‌تر آنها به DNA می‌باشد. این بازشدن فیبرهای ۳۰ نانومتری و تراکم‌زدایی کروماتین سبب تولید **اوکروماتین** با بسته‌بندی سُست‌تر می‌شود که شکل دارای فعالیت رونویسی DNA است. متیلاسیون زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه بازی (لیزین و آرژینین) سبب تسریع در اثر مخالف می‌شود و وقتی همراه با کاهش استیلاسیون است، به شکل شدیداً متراکم غیرفعال کروماتین، تحت عنوان **هتروکروماتین** مشخص می‌گردد. در سر تا سر چرخه سلولی، ژن‌هایی که دائماً سرکوب هستند و سایر نواحی رونویسی‌نشونده نظیر سانترومرها، تلومرها و DNA «آشغال[2]» به‌صورت متراکم باقی می‌مانند.

الگوی تغییرات کووالان (**کد هیستونی**) یک راه شدیداً قابل‌تنظیم برای کنترل بیان ژن فراهم می‌کند (ارتباط بالینی ۸-۲). در حالی که این کد مستلزم تغییری در توالی DNA نیست (**اپی‌ژنتیکی** است)، به دلیل کوئوردیناسیون بین تغییر هیستونی و متیلاسیون DNA در موقعیت ۵ داکسی‌سیتیدین، قابل وراثت است (شکل ۲۳-۲).

۵-۲ • توالی و فعالیت DNA

اندازه و ترکیب بازی متوسط DNA بین گونه‌های مختلف، بسیار متفاوت است. چیزی که DNA یک گونه را منحصر به فرد می‌کند، توالی نوکلئوتیدی آن است. تا همین چند سال گذشته، تعیین توالی نوکلئوتیدی DNA ژنومی یک کار وحشتناک بود. فناوری که در ارتباط با طرح ژنوم انسانی ابداع شد، سبب تسریع در سرعت تعیین توالی DNA شده است و تاکنون توالی‌های DNA بیش از ۱۰۰۰ گونه برای آنالیز در دسترس قرار گرفته‌اند.

آندونوکلئازهای محدودکننده و پالیندروم‌ها

یکی از رخدادهای کلیدی در ابداع روش‌هایی جهت تعیین توالی DNA ژنومی، کشف **آندونوکلئازهای محدودکننده**[3] بود. این آنزیم‌ها DNA دو رشته را در توالی اختصاصی با برش هر دو رشته، می‌شکنند (شکل ۴۴-۲). باکتری‌ها آنزیم‌های محدودکننده‌ای را برای دفاع در برابر عفونت حاصل از فاژها تولید می‌کنند. به دنبال شکستن DNA ویروسی، این DNA در معرض تخریب نهایی توسط اگزونوکلئازهای باکتریایی غیراختصاصی قرار می‌گیرد. DNA باکتریایی می‌تواند از طریق متیلاسیون توالی-اختصاصی، در برابر این شکست محافظت شود. جایگاه‌های شناسایی برای متیلازهای محدودکننده مرتبط با این جایگاه‌ها برای آندونوکلئازها هستند. متیلاسیون بازهای اختصاصی در داخل جایگاه شناسایی مانع

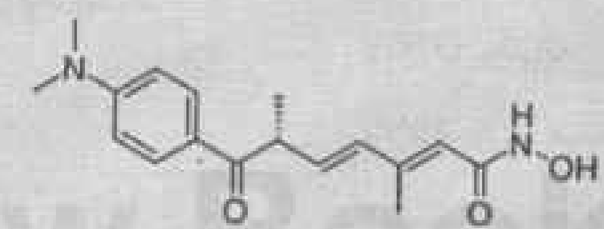
1. Histone remodeling 2. Junk 3. Restriction endonuleases

ارتباط بالینی ۸-۲

درمان‌های اپی‌ژنتیکی برای سرطان

پیشرفت به سمت سرطان می‌تواند مستلزم تغییرات اپی‌ژنتیکی باشد که بر روی فرایندهایی نظیر پیشرفت چرخه سلولی، ترمیم آسیب سلولی، و مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) اثر دارند. یکی از این نوع تغییرات، بازسازی کروموزومی است که به‌عنوان هدفی در درمان سرطان مورد توجه زیادی قرار گرفته است. در تعدادی از سرطان‌ها شامل انواع مربوط به کولون، پروستات، پستان و سرویکال، هیستون داستیلازها که مسئول برداشت گروه‌های استیل از لیزین و آرژنین هستند، به تعداد بیشتری بیان می‌شوند. اسیدهای هیدروکسامیک نظیر تریکوستاتین A و اسید سوبرویل آنیلید هیدروکسامیک (SAHA) به یک یون روی در جایگاه فعال آنزیم اتصال یافته و داستیلاسیون لیزین‌ها و آرژنین‌های هیستونی را متوقف می‌سازند. این ترکیبات مانع رشد سلول توموری شده و پیشرفت چرخه سلولی را متوقف می‌سازند. به شکل قابل توجهی، اخیراً SAHA تحت عنوان ZolinzaR برای درمان لنفوم پوستی سلول T مورد تصویب قرار گرفته است. سایر تغییرات کد هیستونی نظیر فسفریلاسیون سرین نقش‌هایی در ترمیم و پایداری کروموزوم بازی می‌کنند و همچنین ممکن است اهدافی را برای داروهای ضدپرولیفراتیو فراهم کنند.

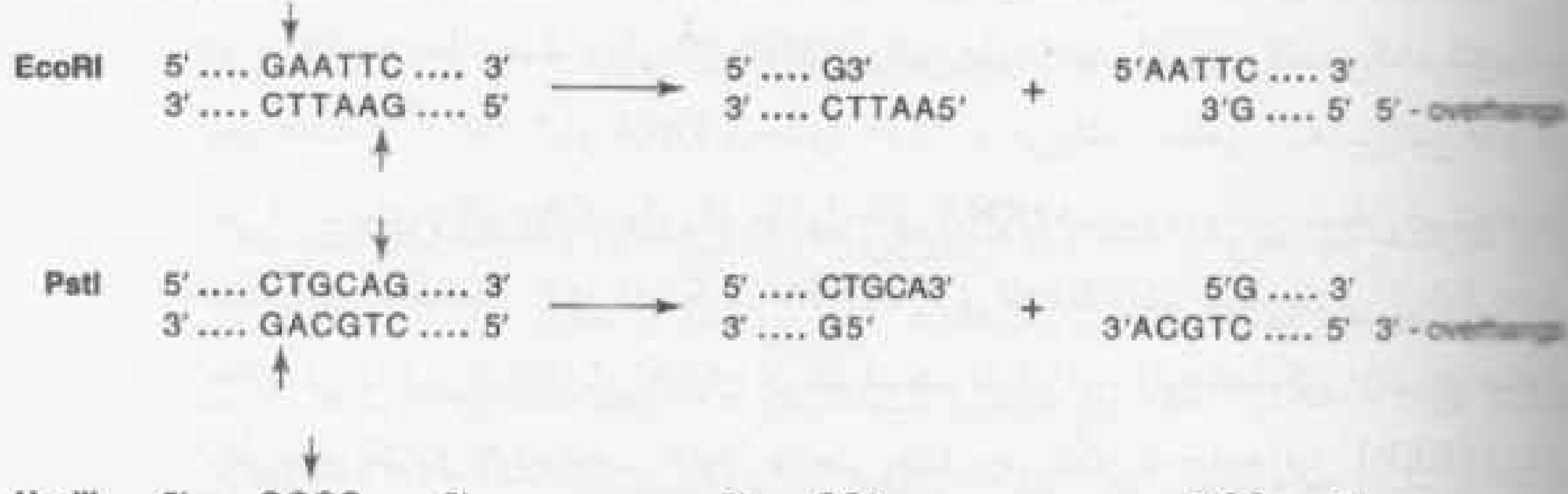
همچنین یک جزء غذایی بالقوه برای کنترل اپی‌ژنتیکی سرطان وجود دارد. اسیدهای چرب زنجیر کوتاه نظیر بوتیرات توسط فلور باکتریایی روده بزرگ تولید می‌شوند و توانایی ضعیفی در تنظیم میتوز، تمایز و آپوپتوز سلول اپی‌تلیال نشان می‌دهند. تجارب نشان داده‌اند که بوتیرات سبب افزایش میزان استیلاسیون هیستونی، احتمالاً از طریق مهار هیستون داستیلاز می‌شود. این داده‌ها مطرح می‌کنند که وضعیت غذایی فرد می‌تواند بر روی کد ژنتیکی و نقش آن در سرطان اثر داشته باشد.



tricostatin A



suberoylanilide hydroxamic acid
(SAHA, Zolinza®)



شکل ۴۴-۲ انواع محصولات حاصل از فعالیت آندونوکلئازهای محدودکننده نوع II. آنزیم‌هایی نظیر EcoRI و PstI هر دو سمت مرکز تقارن پالیندروم را برش می‌دهند که نتیجه آن تولید آویخته‌های تک-رشته می‌باشد. بسیاری از آنزیم‌هایی که به‌طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند، تولید آویخته‌های ′۵ می‌کنند، در حالی‌که برخی همانند حالت نشان داده‌شده برای PastI تولید آویخته‌های ′۳ می‌کنند. نوکلئازهای محدودکننده دیگر، نظیر HaeIII، برش را در عرض مرکز تقارن توالی شناسایی انجام داده و تولید دو انتهای صاف یا هم‌تراز می‌کنند.

تجزیه توسط نوکلئاز مربوطه می‌گردد. معمول‌ترین جایگاه‌ها برای متیلاسیون، موقعیت ۵ سیتوزین و گروه NH_2-6 آدنین هستند. لازم به ذکر است که متیلاسیون بازی برای تنظیم ژن در موجودات عالی نیز حیاتی است.

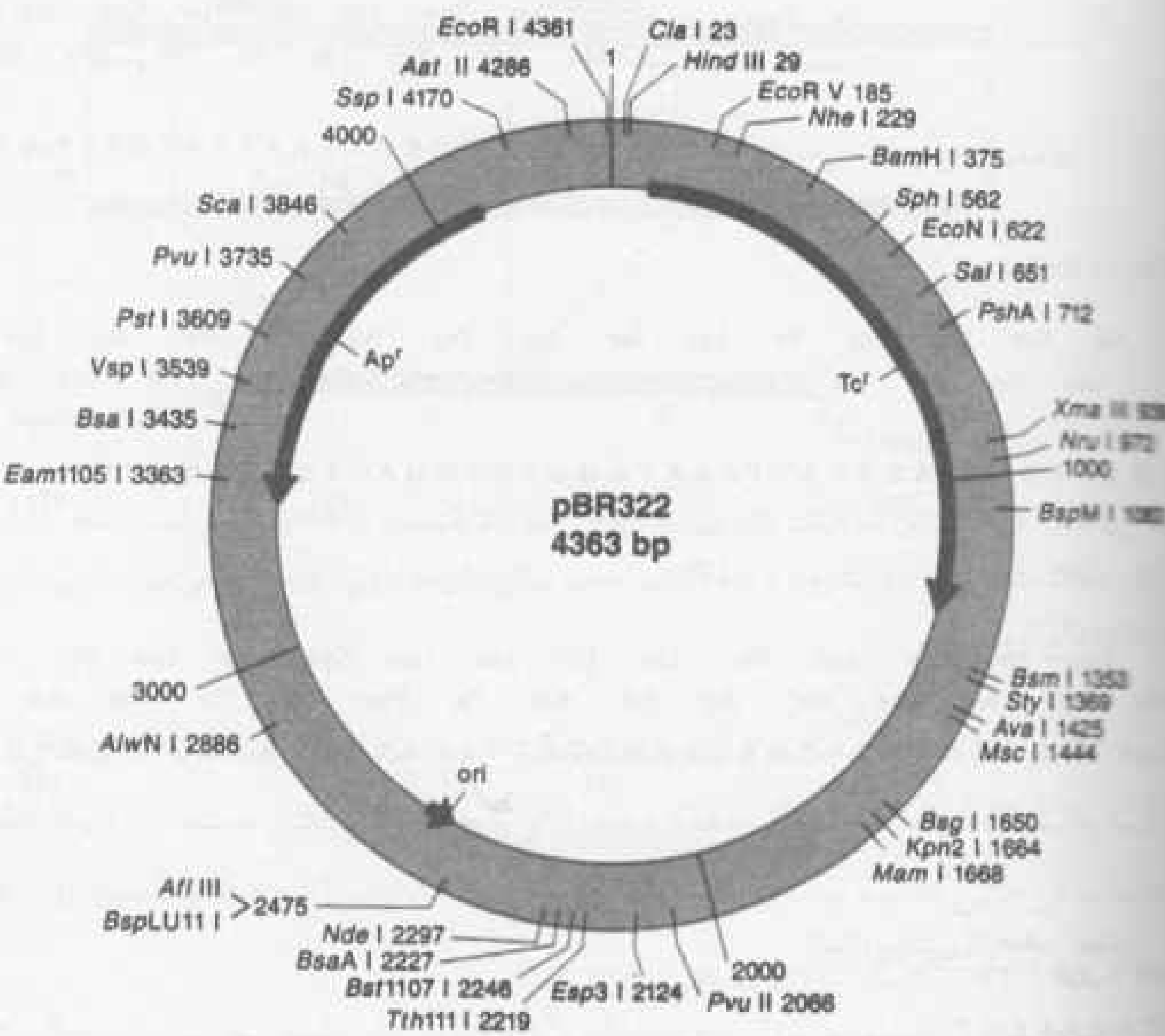
صدها آندونوکلئاز محدودکننده تخلیص شده‌اند. با چند استثناء، اینها توالی‌هایی به طول چهار تا شش نوکلئوتید را شناسایی می‌کنند. برنده‌های نادر، آندونوکلئازهایی با جایگاه‌های شناسایی به‌طور غیرمعمول بلند، به دلیل فراوانی نسبی کمتر شکست هر ملکول DNA بزرگی نظیر کروموزوم اوکاریوتی، با ارزش هستند. برای مثال، Not I یک توالی شناسایی هشت نوکلئوتیدی دارد. توالی‌های شناسایی‌شده اغلب تکرارهای قرینه معکوس یا پالیندروم هستند؛ وقتی هر دو رشته مکمل پالیندروم در جهت $5' \rightarrow 3'$ خوانده می‌شوند، ترتیب بازها یکسان است. در مورد EcoR1 باکتری *E.coli*، این توالی به صورت $5'$-GAATTC-$3'$ می‌باشد. آندونوکلئازهای محدودکننده نوع I و نوع III اطراف جایگاه شناسایی را می‌شکنند، در حالی‌که نوع II به‌طور اختصاصی DNA را در داخل توالی شناسایی می‌شکنند.

آندونوکلئازهای محدودکننده، توالی‌های اختصاصی را شناسایی می‌کنند که فراوانی‌های نسبتاً کمی دارند. این آنزیم‌ها، DNA را بسیار انتخابی قطعه‌قطعه می‌کنند. برای مثال، یک DNA باکتریایی معمولی با 3×10^6 bp به‌چند صد قطعه شکسته می‌شود. ملکول‌های DNA پلاسمیدی ممکن است چند جایگاه شکست برای یک آندونوکلئاز محدودکننده خاص داشته باشند و یا اصلاً جایگاهی برای آن نداشته باشند (شکل ۴۵-۲). لذا یک آنزیم محدودکننده خاص برای هر ملکول خاص DNA تولید یک خانواده بی‌همتا از قطعات یا محصولات حاصل از هضم محدود می‌کند. دسترسی به آنزیم‌های محدودکننده و ابداع تکنیک‌های الکتروفورز ژلی برای جداسازی قطعات DNA، تعیین توالی‌ها را ساده نموده‌اند (ص ۳۵۰).

بیشتر DNA پروکاریوتی پروتئین‌های اختصاصی را کد می‌کنند

در پروکاریوت‌ها درصد بزرگی از DNA پروتئین‌های اختصاصی را کد می‌کند. کل ژنوم *E.coli* شامل $4/6\times10^6$ از DNA و حدود ۴۲۰۰ ژن می‌باشد. تمامی ژن‌ها پروتئین‌ها را کد نمی‌کنند. برای مثال، ۸۰ ژن برای کد ملکول‌های tRNA هستند و برخی ممکن است اصلاً ملکول‌های وظیفه‌دار را در کد نکنند. DNA باکتری *E.coli* تراکم بسیار بالایی از توالی‌های اطلاعاتی دارد و اطلاعات تکراری آن کم است. تا ۱٪ این ژنوم متشکل از نسخ متعدد **توالی‌های تکراری** کوتاه تحت عنوان عناصر پالیندرومی تکراری خارج‌ژنی[1] (REP) است. این توالی‌ها در جایگاه‌های تعامل DNA با پروتئین‌های وظیفه‌دار، برای مثال، ناحیه شروع همانندسازی DNA (تحت عنوان OriC)، وجود دارند. در OriC، توالی‌های REP یک توالی مشترک با ۳۴ نوکلئوتید را دارند و به توپوایزومراز II اتصال می‌یابند. عناصر REP با توالی GCTGGTGG (جایگاه‌های Chi) به آنزیم RecBCD اتصال می‌یابد که نوترکیبی

1. Repeated extragenic palindromic



شکل ۴۵-۲ نقشه محدودکننده برای DNA پلاسمیدی. پلاسمید باکتریایی pBR322 یک DNAحلقوی ۴۳۶۳ bp با یک مبداء همانندسازی (ori) و ژن‌هایی برای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (Apʳ) و تتراسیکلین (Tcʳ) است. موقعیت توالی‌های DNAبی‌همتاکه توسط تعدادی از آندونوکلئازهای محدودکننده مورد شناسایی قرار می‌گیرند، مشخص شده‌اند. سایر آندونوکلئازها ممکن است این پلاسمید را در چندین محل بشکنند و یا اصلاً آن را نشکنند. برای مثال توالی شناسایی Bgl II در سه موقعیت بر روی این پلاسمید وجود دارد، ولی Bgl II این پلاسمید را اصلاً نمی‌شکند.

DNA را آغاز می‌کند. جایگاه‌های Chi به‌طور منظم در فواصل حدود ۴۰۰۰ bp وجود دارند. در موجودات کوچکتری نظیر باکتریوفاژها که توالی اولیه DNA نشان می‌دهد که ژن‌های ساختمانی (توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده پروتئین) همیشه موقعیت‌های فیزیکی انحصاری ندارند، اطلاعات ژنتیکی با تراکم حتی بیشتری وجود دارند. در عوض، این ژن‌ها اغلب با یکدیگر همپوشان هستند؛ این موضوع توسط توالی نسبی فاژ ϕX174 نشان داده می‌شود (شکل ۴۶-۲). این همپوشانی سبب استفاده کارآمد و اقتصادی DNA محدود موجود شده و ممکن است ترتیب بیان ژن را کنترل کند.

تنها درصد کوچکی از DNA اوکاریوتی حاوی ژن‌های وظیفه‌دار است

اوکاریوت‌ها ژنوم بسیار بیشتری نسبت به پروکاریوت‌ها، از حدود $۱٫۵\times۱۰^{۷}$ bp برای مخمر تا $۱٫۱۵\times۱۰^{۱۱}$bp در ژنوم هاپلوئید گیاه سوسن *Fritillaria assyrica*، دارند. گرچه، نتایج حاصل از طرح ژنومی انسان نشان می‌دهند که ژنوم انسان تنها ۰۰۰ ۲۰ تا ۰۰۰ ۲۵ ژن را کد می‌کند. لذا ضرورتی ندارد اطلاعات ژنتیکی با تراکم موجود در باکتری‌ها متراکم شود. یک DNA معمولی پستانداران که تنها هفت برابر ژن‌های موجود در *E.coli* ژن دارد، ۵۰۰ برابر بیشتر از *E.coli* حاوی DNA است. در حقیقت، تنها ۲٪ تا ۴٪ از DNA موجود در یک سلول پستانداران ممکن است برای تمامی ژن‌های آن کافی باشد. مقداری از DNA باقیمانده، نظیر DNA موجود در سانترومرها و تلومرها، یک عملکرد کاملاً مشخص دارند.

پروتئین A .... Glu Ser Lys Asn Tyr Leu Asp Lys Ala Gly Ile Thr Thr
پروتئین K مبداء Met Ser Arg Lys Ile Ile Leu Ile Lys Gln Glu Leu Leu Leu

توالی نوکلئوتیدی .... ATGAGTCGAAAAATTATCTTGATAAAGCAGGAATTACTACT
51 61 71 81 91

Ala Cys Leu Arg Ile Lys Ser Lys Trp Thr Ala Gly Gly Lys انتهای پروتئین A
Leu Val Tyr Glu Leu Asn Arg Ser Gly Leu Leu Ala Glu Asn Glu Lys Ile Arg Pro Ile
پروتئین C مبداء Met Arg Lys Phe Asp Leu
GCTTGTTTACGAATTAAATCGGAGTGGACTGCTGGCGGAAAATGAGAAAATTCGACCTAT
101 111 121 131 141 151

Leu Ala Gln Leu Glu Lys Leu Leu Leu Cys Asp Leu Ser Pro Ser Thr Asn Asp Ser Val
Ser Leu Arg Ser Ser Arg Ser Ser Tyr Phe Ala Thr Phe Arg His Gln Leu Thr Ile Leu
CCTTGCGCAGCTCGAGAAGCTCTTACTTTGCGACCTTTCGCCATCAACTAACGATTCTGT
161 171 181 191 201 211

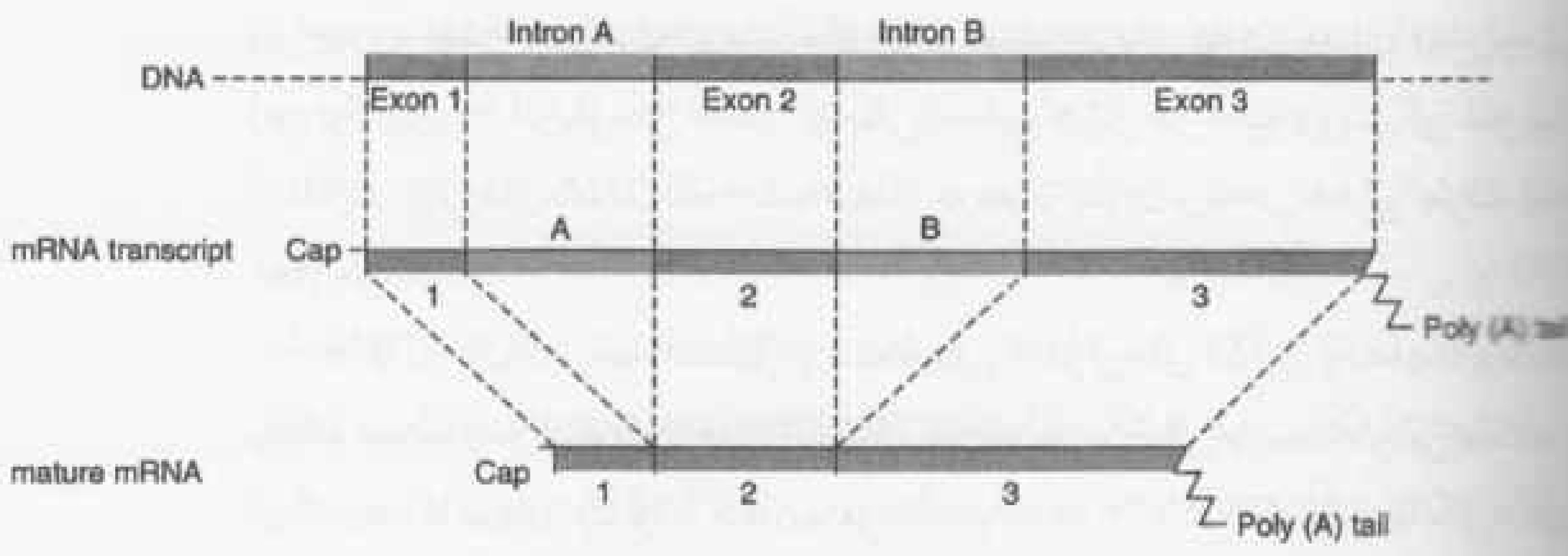
Lys Asn انتهای پروتئین K
Ser Lys Thr........................ پروتئین C ادامه دارد
CAAAAACT ....
219

شکل ۴۶-۲ توالی‌های نوکلئوتیدی نسبی ژن‌های مجاور و همپوشان فاژ ϕX174. توالی پروتئین K، نوکلئوتیدهای ۵۱ تا ۲۱۹، در شکل نشان داده شده است. این توالی کدکننده است. قسمتی از این توالی، نوکلئوتیدهای ۵۱ تا ۱۳۳، قسمتی از پروتئین A را کد می‌کند. قسمت دیگر این توالی، نوکلئوتیدهای ۱۳۳ تا ۲۱۹، کدکننده قسمتی از پروتئین C است. همپوشانی‌های مشابهی بین سایر ژن‌های ϕX174 ذکر شده است.

هیچ فعالیت اختصاصی را نمی‌توان برای بیشتر DNA غیرکدکننده در نظر گرفت و به همین دلیل به آن DNA آشغال[1] گفته می‌شود. شواهد رو به افزایشی وجود دارند که نشان می‌دهند، DNA آشغال یک نقش حیاتی در تنظیم بیان ژن در طی نمو دارد. به‌طور متناقض میزان DNA آشغال ارتباط بهتری با پیچیدگی موجود زنده تا تعداد ژن‌ها دارد.

ژن‌های اوکاریوتی همپوشان نیستند و به اندازه حدود 40 000 bp از یکدیگر فاصله دارند. هر چند، برخی ژن‌ها ممکن است در نواحی که حاوی ژن‌هایی هستند که به طریق کاملاً هماهنگی بیان می‌شوند، به یکدیگر نزدیکتر باشند (دستجات ژنی[2]). اکثر ژن‌های اوکاریوتی توسط توالی‌های نوکلئوتیدی مداخله‌گر غیرکدکننده، یعنی **اینترون‌ها**، به شکل منقطع وجود دارند (شکل ۴۷-۲). توالی‌های موجود در ژن که، به شکل محصول RNA نهایی (RNA بالغ) یا به صورت پروتئین، بیان می‌شوند را **اگزون** گویند. اینترون‌ها طی پردازش رونوشت RNA برداشت شده و اگزون‌ها بیکدیگر متصل می‌گردند. این نوع خیاطی رونوشت اولیه را **اسپلایسینگ**[4] گویند. توالی و اندازه اینترون‌ها از نظر اندازه در بین گونه‌ها

1. Junk DNA 2. Gene clusters 3. Tailoring 4. Splicing



شکل ۴۷-۲ **نمایش شماتیک یک ژن اوکاریوتی.** خط بالا قسمتی از DNA ژنومی است. خط پایینی mRNA تولیدی توسط آن را نشان می‌دهد. در این مثال DNA متشکل از دو اینترون و سه اگزون است. توالی‌های اینترونی رونویسی می‌شوند، ولی طی فرآیند اسپلایسینگ برداشت می‌گردند؛ نتیجه تولید mRNA بالغ است.

بسیار متفاوت است. در مجموع اینترون‌ها ممکن است ۵ تا ۱۰ برابر طول اگزون‌هایی را داشته باشند که آنها را از یکدیگر جدا کرده‌اند. اکثر ژن‌ها حداقل یکبار توسط اینترون‌ها قطع شده‌اند، در حالی که بقیه بیشتر قطع می‌شوند. برخی ژن‌ها، نظیر ژن مربوط به اینترفرون -α انسانی، فاقد اینترون هستند.

اینترون‌ها در ژن‌های مربوط به مهره‌داران و گیاهان گل‌دار معمول هستند، در حالی که در سایر گونه‌ها کمتر دیده می‌شوند. نقش بیولوژیکی اینترون‌ها واضح نیست. اینترون‌ها ممکن است طی دوره تکامل در زمان نسبتاً جدیدتری، به دلیل مهاجرت عناصر DNA متحرک (ترانس‌پوسون‌ها) از قسمت‌های دیگر ژنوم و قرارگیری آنها در ژن‌های کدکننده پروتئین (ص ۴۳۱)، به‌وجود آمده باشند. در اثر جهش، این الحاق‌ها ممکن است بعداً حرکت خود را از دست داده باشند.

توالی‌های تکراری

در حالی که تکرار توالی‌های خاص DNA در پروکاریوت‌ها بسیار محدود است، DNA اوکاریوت‌ها حاوی توالی‌هایی است که در مورد ژن‌های کدکننده اختصاصی چندین بار و در مورد برخی توالی‌های ساده نسبتاً کوتاه تا میلیون‌ها بار در هر ژنوم تکرار می‌شوند. برحسب گونه، DNA تکراری ممکن است ۳٪ تا ۸۰٪ کل DNA را شامل شود. در ژنوم پستانداران، شامل ژنوم انسانی، ۲۰٪ تا ۳۵٪ DNA تکراری است. توالی‌ها را می‌توان به انواع تک نسخه، **با تکرار متوسط، شدیداً تکراری و تکرار معکوس** طبقه‌بندی نمود. محتوای DNA تک-نسخه در بین اوکاریوت‌ها متفاوت است. مرز دقیق بین انواع مختلف* DNAهای تکراری دقیقاً مشخص نیست.

حدود نیمی از ژنوم انسانی متشکل از توالی‌های بی‌همتا است، ولی تنها بخش کمی از آن پروتئین‌ها را کد می‌کند. مقداری از DNA شامل ژن‌های کاذب می‌باشد که خود شامل توالی‌هایی از DNA است که هُمولوژی نوکلئوتیدی قابل‌توجهی با یک ژن وظیفه‌دار دارد،

ولی حاوی جهش‌هایی است که مانع بیان ژن می‌شوند. ژن‌های کاذب به میزان قابل توجهی ژنوم اوکاریوتی را افزایش می‌دهند، در حالی که هیچ نقشی در محتوای ژنتیکی قابل‌بیان آن ندارند. توالی‌های DNA تک-نسخه دیگر به عنوان اینترون و نواحی کنترلی اطراف ژن‌ها عمل می‌کنند.

DNA با تکرار متوسط متشکل از نسخه‌هایی از توالی‌های تکراری یکسان یا با ارتباط نزدیک هستند که از چند بار تا هزاران بار تکرار می‌شوند. این توالی‌ها نسبتاً طولانی هستند و از یک صد تا هزاران نوکلئوتید متفاوت می‌باشند. حدود ۲۰٪ DNA موش خانگی حاوی توالی‌هایی با طول چند صد جفت باز می‌باشد که بیش از یک هزار بار تکرار می‌شوند. حدود ۱۵٪ ژنوم انسانی متشکل از DNA با تکرار متوسط است. برخی از اینها در ژن‌های مربوط به پروتئین‌های شدیداً فراوان و برای ملکول‌های RNA ریبوزومی (rRNA) هستند. برای مثال، توتیای دریایی صدها نسخه ژن هیستونی دارد. اوکاریوت‌ها معمولاً صدها نسخه ژن کدکننده rRNA را دارند. عملکرد توالی‌های با تکرار متوسط دیگر کاملاً مشخص نیست.

به‌طور طبیعی، توالی‌های تک- نسخه و تکراری متوسط با یک الگوی منظم تحت عنوان **الگوی پراکنده** در یک کروموزوم وجود دارند که شامل قطعاتی از DNA تک-نسخه و DNA تکراری متوسط متناوب می‌باشد. **عناصر پراکنده بلند**[1] (LINEs) متشکل از توالی‌هایی به طول چندین هزار نوکلئوتید و تا ۱۰۰۰۰ نسخه در هر ژنوم هستند. در دو سمت این عناصر، توالی‌هایی وجود دارند که تکرارهای مستقیم هستند. خانواده Alu نمونه‌ای از **عناصر پراکنده کوتاه**[2] (SINEs) است، توالی که عملکرد آن ناشناخته است و بخش مهمی (حدود ۵٪) از ژنوم انسانی را شامل می‌شود. توالی‌های Alu حدود bp ۳۰۰ طول دارند و بیش از ۵۰۰ ۰۰۰ بار تکرار شده‌اند. ساختمان تکرارهای پراکنده کوتاه، شامل خانواده Alu، یادآور ترانس‌پوسون‌ها هستند.

حدود ۱٪ تا ۱۵٪ DNA ژنوم اوکاریوتی شامل توالی‌هایی است که معمولاً کمتر از ۲۰ نوکلئوتید طول دارند و هزاران تا میلیون‌ها بار تکرار شده‌اند. اکثر توالی‌های شدیداً تکراری یک ترکیب بازی مشخص دارند و آنها را می‌توان با بریدن DNA به قطعاتی به طول چند صد نوکلئوتید و تفکیک این قطعات به‌واسطه سانتریفوژ شیب چگالی جدا نمود. این قطعات را **DNA قمری**[3] گویند، زیرا بعد از سانتریفوژ به صورت اقماری نسبت به قسمت عمده DNA ظاهر می‌شوند. سایر توالی‌های شدیداً تکراری که قابل جداسازی به طریق سانتریفوژ نیستند را می‌توان براساس خصوصیت سریع سردشدن آنها شناسایی نمود. این DNAهای شدیداً تکراری را **DNA توالی - ساده**[4] نیز می‌نامند. توالی‌های ساده معمولاً در DNA اکثر، اگر نه تمام، اوکاریوت‌ها وجود دارند. در برخی گونه‌ها، یک توالی اصلی وجود دارد، در حالی در بقیه، چندین توالی ساده تا یک میلیون بار تکرار می‌شوند. DNA توالی ساده را اغلب می‌توان به صورت DNA قمری جدا نمود. توالی که د...

---
1. Long interspersed elements 2. Short interspersed elements 3. Satellite DNA 4. Simple-sequence DNA

سانترومرهای اوکاریوت‌های عالی یافت می‌شود، متشکل از هزاران نسخه پشت سر هم یک یا چند توالی کوتاه می‌باشد. توالی‌های قمری تنها bp ۱۰-۵ طول دارند و جزئی از تلومرها هستند که در این محل نقش کاملاً مشخص‌شده‌ای در همانندسازی DNA دارند. مقداری DNA توالی - ساده بلندتر مورد شناسایی قرار گرفته است. برای مثال، در ژنوم میمون سبز افریقایی یک قطعه bp ۱۷۲ شدیداً تکرار می‌شود که حاوی مقداری توالی تکراری است.

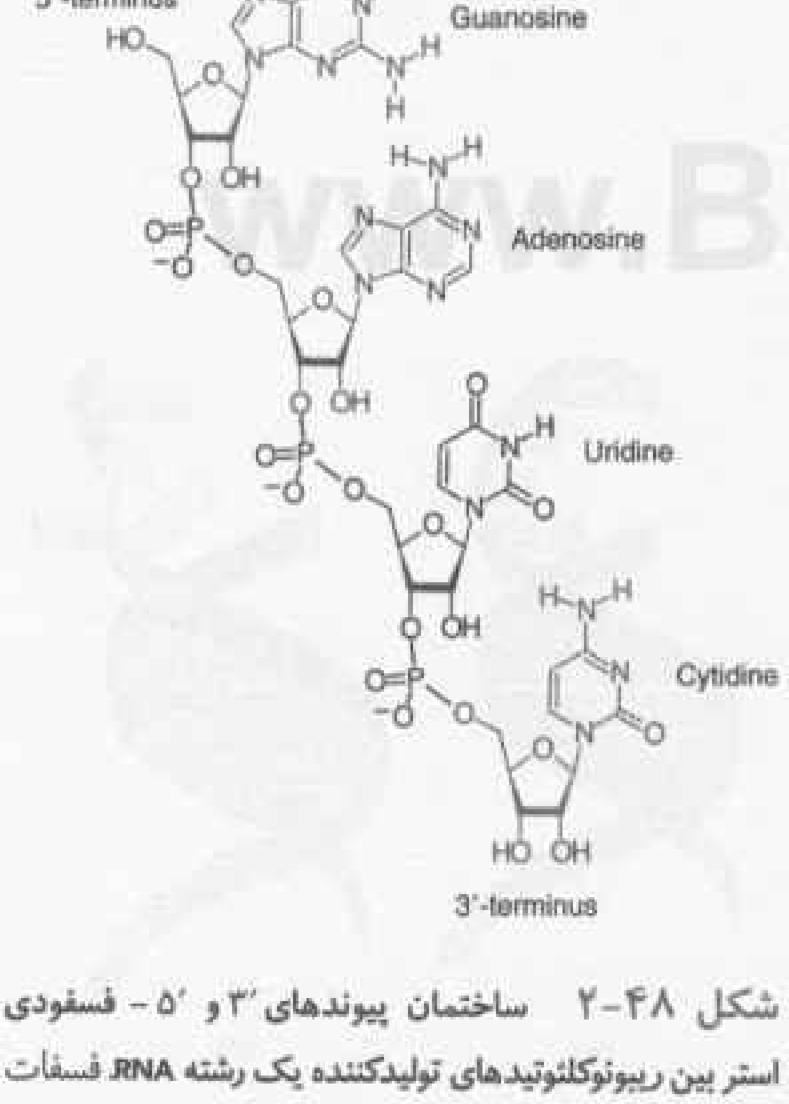
تکرارهای معکوس[1] یک موتیف ساختمانی از DNA هستند. تکرارهای معکوس کوتاه، به طول تا شش نوکلئوتید، برای مثال توالی پالیندرومی GAATTC، به‌طور شانسی یکی در هر ۳۰۰۰ نوکلئوتید وجود دارد. این نوع تکرارهای کوتاه نمی‌توانند همانند توالی‌های پالیندرومی بلندتر، یک ساختمان صلیبی پایدار به‌وجود آورند. توالی‌های تکراری معکوسی که به اندازه کافی برای تولید صلیب‌های پایدار بلند هستند، احتمالاً شانسی وجود ندارند و بهتر است به عنوان یک کلاس مجزای توالی اوکاریوتی طبقه‌بندی شوند. در DNA انسانی حدود ۲ میلیون تکرار معکوس وجود دارد که طول متوسط آنها حدود bp ۲۰۰ است؛ هرچند، توالی‌های معکوس با بیش از bp ۱۰۰۰ یافت شده‌اند. اکثر توالی‌های تکراری معکوس ۱۰۰۰ بار یا بیشتر در هر سلول تکرار می‌شوند.

۶-۲ • ساختمان RNA

RNA پلیمری از ریبونوکلئوزید ′۵-منوفسفات‌ها است

RNA پلیمر خطی از ریبونوکلئوزید منوفسفات‌ها است. بازهای پورینی RNA شامل آدنین و گوانین هستند؛ پیریمیدین‌ها نیز شامل سیتوزین و اوراسیل می‌باشند (شکل ۲-۲ را ببینید). به غیر از اوراسیل که جایگزین تیمین شده است، اینها همان بازهای موجود در DNA هستند. نوکلئوتیدهای A، C، G و U (شکل ۳-۲ را ببینید) طی رونویسی در داخل RNA قرار داده می‌شوند. بسیاری از ملکول‌های RNA همچنین حاوی نوکلئوتیدهای تغییر یافته هستند که **طی پردازش بعد از رونویسی** تولید می‌شوند. نوکلئوتیدهای تغییریافته به‌خصوص مشخصه گونه‌های RNA پایدار (برای مثال، tRNA و rRNA) هستند؛ هرچند، برخی نوکلئوتیدهای متیله نیز در mRNA اوکاریوتی وجود دارند. در اکثر موارد، نوکلئوتیدهای تغییریافته موجود در RNA، یک نقش تنظیمی ظریف، به‌جای نقش ضروری، در سلول دارند.

پیوندهای ′۳ فسفودی‌استری RNA تولید اسکلتی می‌کند که از آن بازها امتداد می‌یابند (شکل ۴۸-۲). ملکول‌های RNA اوکاریوتی از طول حدود ۲۰ نوکلئوتید تا بیش از ۲۰۰۰۰۰ نوکلئوتید متفاوت هستند. هر ملکول RNA مکمل توالی‌های بازی قسمت‌های اختصاصی از تنها یک رشته DNA می‌باشند. لذا برخلاف ترکیب بازی DNA، نسبت‌های مولی (A+U) و (G+C) در RNA برابر نیستند. RNA سلولی از نوع خطی و تک رشته است. RNA



شکل ۴۸-۲ ساختمان پیوندهای ′۳ و ′۵ - فسفودی استر بین ریبونوکلئوتیدهای تولیدکننده یک رشته RNA. فسفات گروه OH - ′۳ یک ریبوز به گروه OH - ′۵ ریبوز بعدی متصل می‌شود. این اتصال سبب تولید یک پلی‌نوکلئوتید با یک اسکلت قند - فسفات می‌شود. بازهای پورینی و پیریمیدینی از محور اسکلت خارج شده و ممکن است با بازهای مکمل ایجاد جفت باز نموده تا تولید نواحی جفت - بازی مارپیچی - دوتایی شود.

1. Inverted repeats

دو-رشته پایدار در سلول وجود ندارد. به‌نظر می‌رسد که این نوع RNA قسمتی از پاسخ سلولی به عفونت ویروسی باشد، زیرا برخی ژنوم‌های ویروسی متشکل از RNA دو-رشته هستند و RNA دو-رشته ترکیب واسطی در همانندسازی RNA ویروس‌های تک-رشته است.

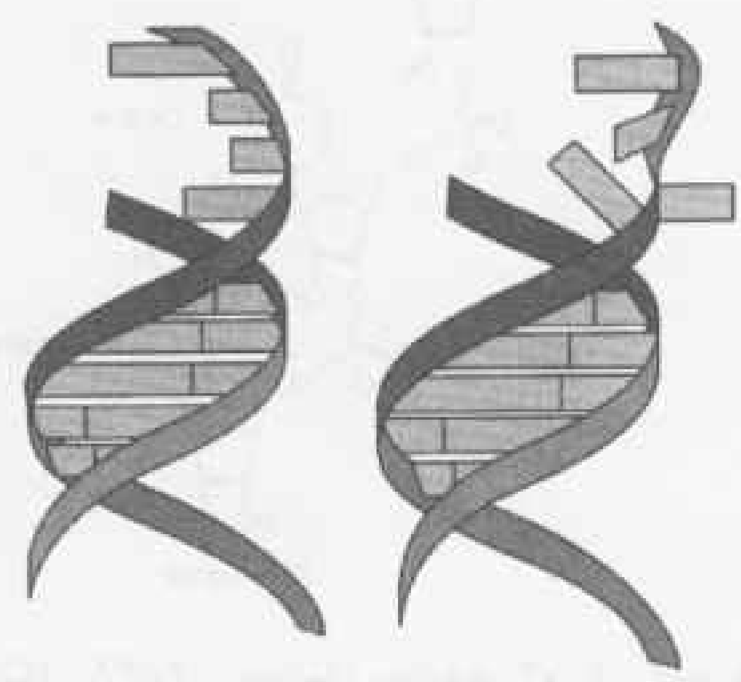
از نظر شیمیایی، RNA مشابه DNA است. هم پیوندهای فسفودی‌استری با بار منفی دارند و بازها نیز از نظیر شیمیایی بسیار مشابه هستند. تفاوت بین DNA و RNA بیشتر به دو دلیل است. اول، RNA حاوی ریبوز به‌جای ′۲-داکسی‌ریبوز به‌عنوان جزء قندی نوکلئوتید است، و دوم، ملکول‌های RNA عموماً تک رشته به‌جای دو رشته هستند.

گروه ′۲-هیدروکسیل سبب می‌شود تا پیوندهای فسفودی‌استری یک ملکول RNA در برابر هیدرولیز شیمیایی، به‌خصوص در شرایط قلیایی، حساس‌تر از این پیوندها در DNA باشد (شکل ۱۱-۲ را ببینید). ناپایداری شیمیایی RNA در ناپایداری متابولیکی آن منعکس می‌باشد. برخی ملکول‌های RNA، نظیر mRNA باکتریایی ظرف چند دقیقه سنتز، استفاده و تخریب می‌شوند. سایر ملکول‌ها، نظیر rRNA انسانی، از نظر متابولیکی پایدارتر هستند و عمر آنها در حدود چند روز است. با این وجود، حتی پایدارترین ملکول‌های RNA بسیار ناپایدارتر از DNA می‌باشند.

ساختمان دوم RNA مستلزم ایجاد جفت باز درون‌ملکولی است

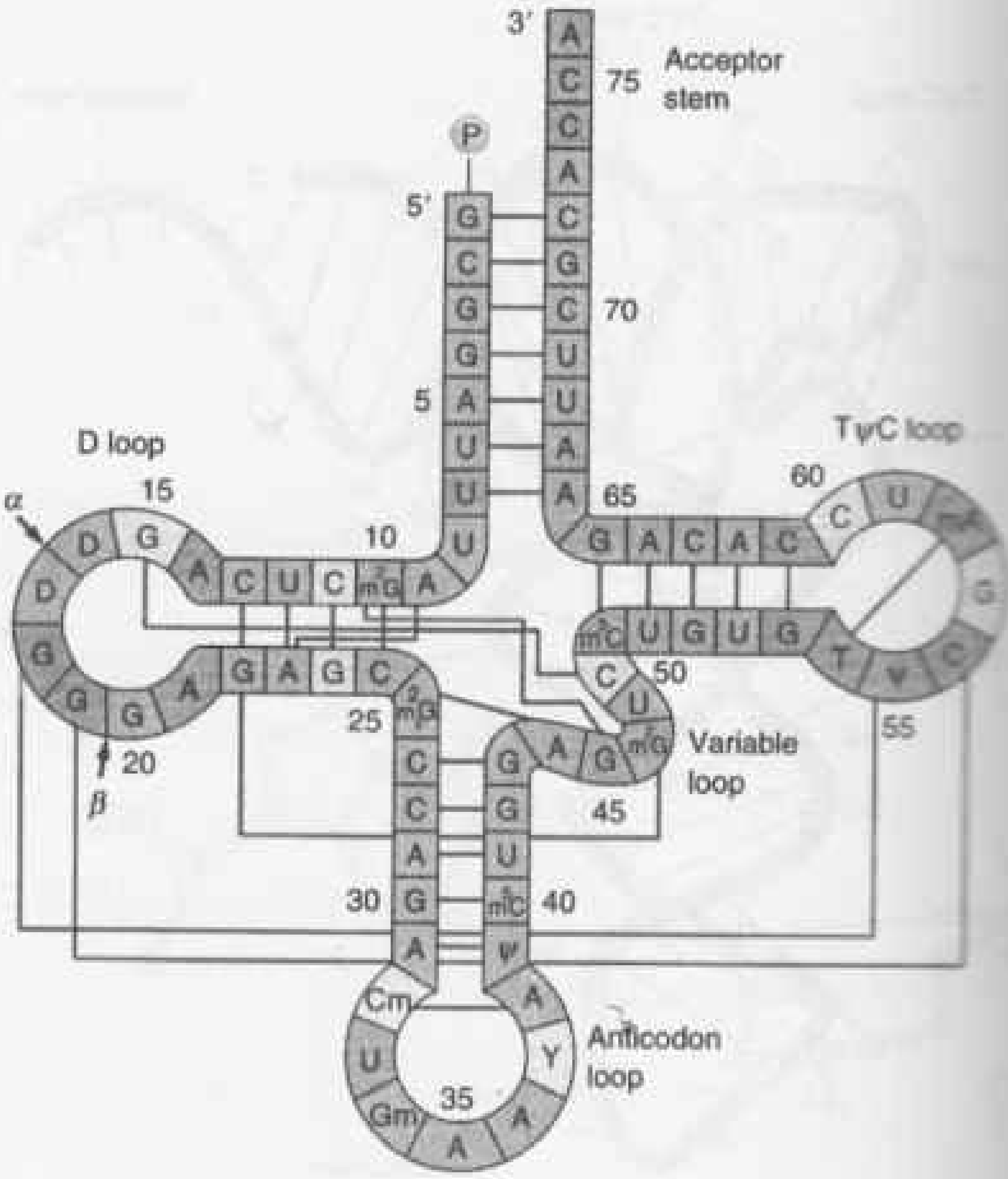
از آنجایی که ملکول‌های RNA تک رشته هستند، معمولاً ماریپچ‌های دوتایی وسیعی را به‌وجود نمی‌آورند. در عوض، ساختمان دوم یک ملکول RNA از نواحی نسبتاً کوتاه ایجاد جفت بازهای درون‌ملکولی حاصل می‌شود. حتی توالی‌های جفت‌نشده ملکول‌های RNA تک-رشته ممکن است حاوی ساختمان ماریپچی قابل‌توجه باشند (شکل ۴۹-۲). ماریپچ‌های موجود در RNA معمولاً از نوع A بوده و ۱۱ نوکلئوتید در هر دور دارند.

نواحی ساقه-قوس[1] ماریپچی-دوتایی در RNA اغلب تولید «سنجاق[2]» می‌کنند. تنوع قابل توجهی در جزئیات ساختمانی ظریف ساختمان‌های سنجاقی، شامل طول نواحی جفت-بازی و اندازه و تعداد قوس‌های جفت‌نشده، وجود دارد (شکل ۵۰-۲). ملکول‌های RNA ناقل مثال‌های فوق‌العاده‌ای از تراکم بازی و ایجاد پیوند هیدروژنی در یک ملکول RNA تک-زنجیری هستند (شکل ۵۱-۲). حدود ۶۰٪ بازها در چهار ساقه ماریپچی-دوتایی جفت می‌شوند و دو قوس در تعامل با یکدیگر قرار دارند که یک ساختمان L شکل را به‌وجود می‌آورند. ناحیه آنتی‌کدون موجود در tRNA یک قوس جفت‌نشده متراکم-بازی متشکل از هفت نوکلئوتید است. ماریپچ نسبی حاصل از تراکم بازی موجود در این قوس، از طریق ایجاد جفت باز، به یک کدون مکمل در mRNA اتصال می‌یابد و به این طریق امکان ترجمه فراهم می‌گردد.



شکل ۴۹-۲ ساختمان ماریپچی RNA. مدل‌ها یک ساختمان ماریپچی حاصل از (a) تراکم بازی در انتهای CCA ملکول tRNA و (b) عدم وجود یک ماریپچ منظم در زمان عدم ایجاد تراکم در این ناحیه غیرجفت بازی را نشان می‌دهند.

1. Stem-loop 2. Hairpin

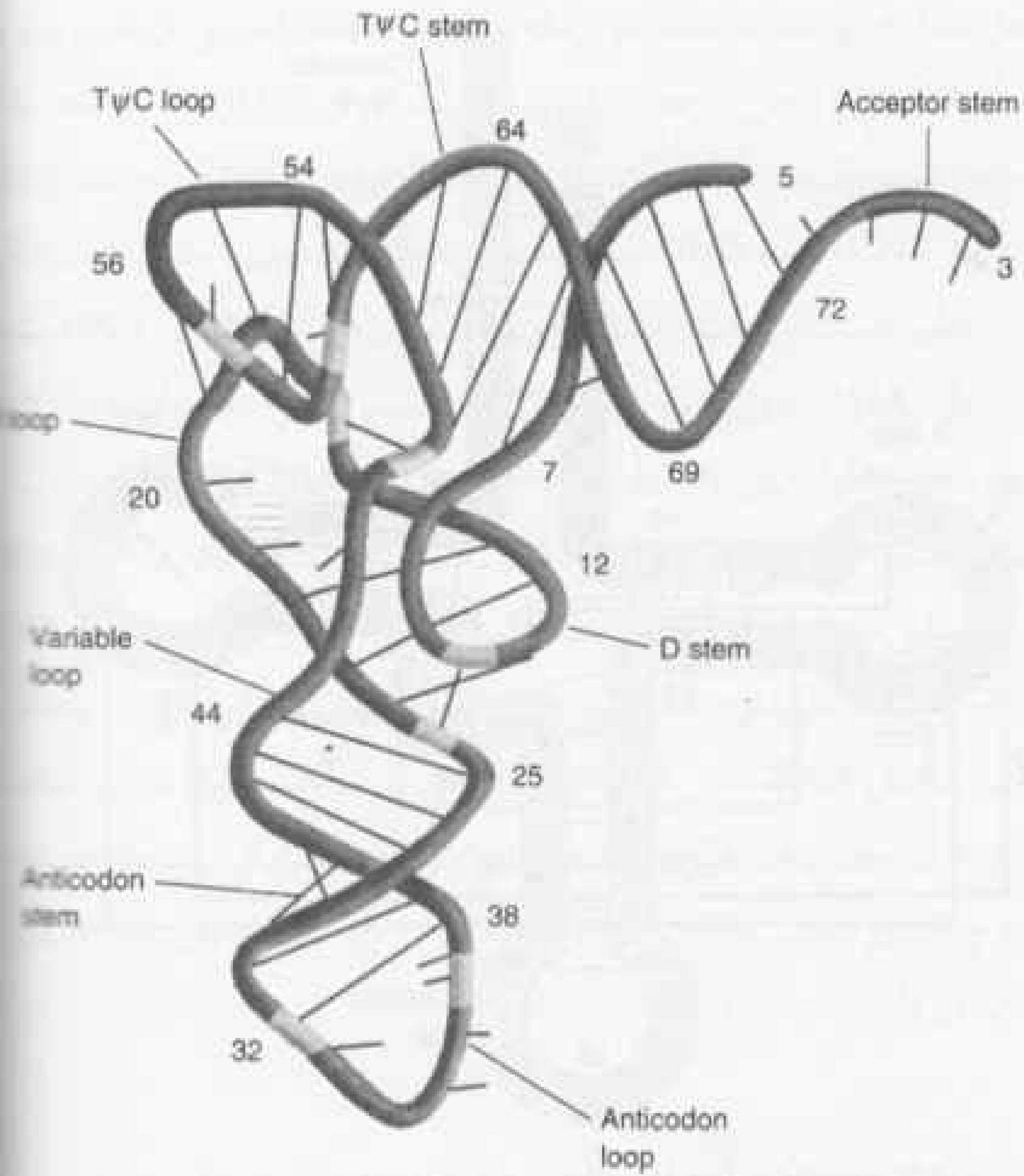


شکل ۵۰-۲ **ساختمان برگ‌شبدری tRNA.** دیاگرام برگ‌شبدری ساختمان دو-بُعدی و توالی نوکلئوتیدی $tRNA^{phe}$ مخمر، خطوط قرمز متصل‌کننده نوکلئوتیدهای حلقوی‌شده، بازهای دارای پیوندهای هیدروژنی را نشان می‌دهند. مربع‌های پُر نوکلئوتیدهای ثابت را نشان می‌دهند. مربع‌های منقطع یک پورین یا پیریمیدین ثابت را نشان می‌دهند. اضافه‌شدن نوکلئوتیدها در قوس D ملکول‌های مختلف tRNA در موقعیت‌های α و β انجام می‌شود.

ملکول‌های RNA ساختمان‌های سوم دارند

ساختمان‌های مربوط به ملکول‌های RNA وظیفه‌دار پیچیده‌تر از آن چیزی است که بواسطه ایجاد تراکم بازی و پیوند هیدروژنی مورد اشاره در بالا به‌وجود می‌آید. به‌خصوص، بازهای موجود در نواحی جفت‌نشده می‌توانند پیوندهای هیدروژنی تشکیل دهند یا با یکدیگر و با قسمت‌های مارپیچی ملکول تعامل کنند. در بدن ملکوهای RNA ملکول‌های پویایی هستند که طی سنتز، پردازش و فعالیت، کونفورماسیون‌های خود را تغییر می‌دهند. پروتئین‌های همراه با ملکول‌های RNA اغلب سبب پایداری ساختمان RNA می‌شوند. در حقیقت، RNA سلولی معمولاً به صورت کمپلکس‌های RNA-پروتئینی، به‌جای ملکول‌های RNA آزاد، فعالیت می‌کنند.

ساختمان سوم ملکول‌های RNA حاصل ایجاد تراکم بازی و پیوندهای هیدروژنی است. این پیوندها بین قسمت‌های مختلف ملکول تشکیل شده و نمونه‌هایی از آنها را می‌توان در tRNA مشاهده نمود. در محلول، tRNA به یک کونفورماسیون متراکم «L- شکل» تا می‌شود (شکل ۵۱-۲) که توسط ایجاد جفت-باز واتسون کریک و تعاملات بازی با همکاری بیش از دو نوکلئوتید تثبیت می‌شود. این موضوع در سایر ملکول‌های RNA نیز صادق است. شکل ۵۲a-۲ یک سه بازی کاملاً مشخص‌شده از RNA ریبوزومی باکتریایی را نشان می‌دهد. بازها می‌توانند دهنده اتم‌های هیدروژن برای ایجاد پیوند با اسکلت فسفودی‌استری



شکل ۵۱-۲ ساختمان سوم tRNA. تاشدن سوم ساختمان برگ شبدری $tRNA^{phe}$. پیوندهای هیدروژنی با خطوط عرضی نشان داده شده‌اند. این شکل را با شکل ۵۰-۲ مقایسه کنید.

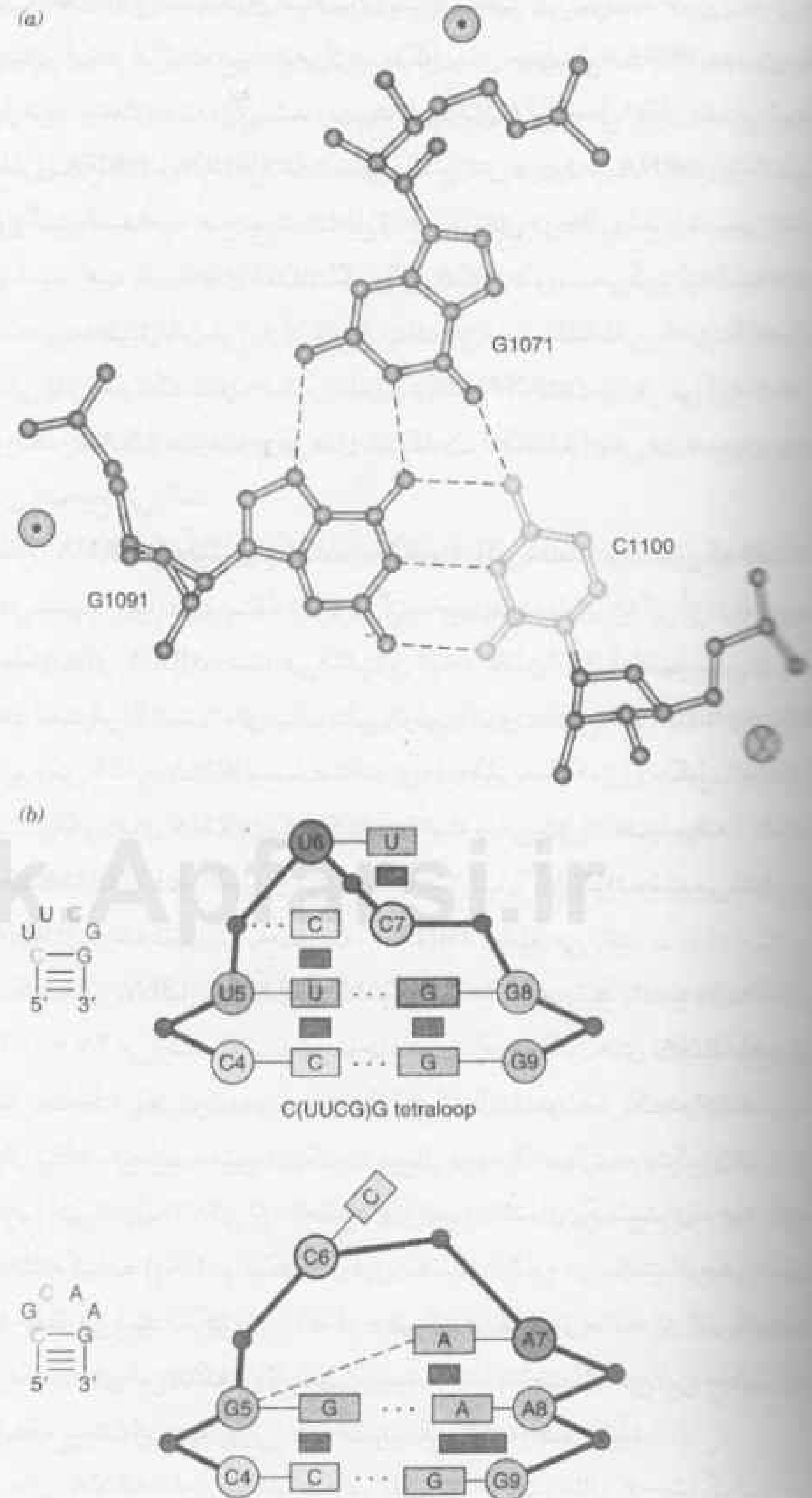
باشند. گروه ۲′ – هیدروکسیل ریبوز نیز دهنده و گیرنده مهمی برای ایجاد پیوند هیدروژنی است. تمامی این تعاملات در شکل تاشده یک ملکول RNA نقش دارند.

سایر خصوصیات سوم از ساختمان سه-بُعدی ملکول‌های RNA در محلول یا شکل کریستالی استنتاج شده و واژه چهارقوس[1] اشاره به توالی‌های اختصاصی (برای مثال، UUCG یا GAGA) دارد که اغلب در انتهای بسته سنجاق‌های RNA یافت می‌شوند (شکل $2-52b$). این چهارقوس‌ها از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی درونی بین بازها و قندها، پایداری بیشتری را در سنجاق‌های RNA ایجاد می‌کنند. چهارقوس‌ها می‌توانند با نواحی از مارپیچ دو رشته یا با قوس‌های داخلی موجود در قسمت‌های دیگر RNA ایجاد پیوند هیدروژنی کرده و به موجب آن یک ساختمان سوم پیچیده را به‌وجود آورند.

۷-۲ • انواع RNA

مرسوم است که ملکول‌های RNA برحسب فعالیت معمول خود به انواع ملکول‌های RNA ناقل، ریبوزومی و پیک طبقه‌بندی شوند؛ هرچند، ملکول‌های RNA فعالیت‌های سلولی مختلف دیگری را نیز برعهده دارند.

1. Tetraloop



شکل ۵۲-۲ پیوندهای هیدروژنی در tRNA. (a) یک سه بازی از RNA ریبوزومی ۲۳S. در این حالت باز سوم (G1071) پیوندهای هیدروژنی با سمت بالا یا هوگستینی هم G1091 و هم C1100 ایجاد می‌کند. (b) دیاگرام شماتیکی که نشان می‌دهد دو چهارقوس RNA، ساختمان‌های مشابهی دارند. هر دو ساختمان از طریق ایجاد تراکم بازهای قوس، توسط پیوندهای هیدروژنی واتسون-کریک بین بازها، و توسط پیوندهای هیدروژنی بین ریشه‌های قند، فسفات و ریبوز تثبیت می‌گردند.

RNA انتقالی دو نقش دارد: فعال‌سازی اسیدهای آمینه و شناسایی کدون‌ها در mRNA

حدود ۱۵٪ کل RNA سلولی از نوع **tRNA** است که یک ترکیب واسط ضروری بین DNA و اطلاعات موجود در پروتئین در عقیده بنیادی است. تولید آنزیمی آمینوآسیل–

tRNA سبب فعال‌سازی اسیدهای آمینه برای سنتز پروتئین می‌شود، به طوری که تولید پیوندهای پپتیدی از نظر انرژتیک مساعد می‌گردد. ملکول‌های آمینوآسیل-tRNA به ریبوزوم‌ه اتصال می‌یابند؛ اسیدهای آمینه برای رشد زنجیرهای پپتیدی به این محل انتقال داده می‌شون (دلیل نامگذاری tRNA). tRNA اطلاعات توالی نوکلئوتیدی موجود در mRNA را شناسای می‌کند تا قرارگیری اسید آمینه صحیح در داخل زنجیر پپتیدی در حال رشد را تضمین کند فعال‌سازی اسید آمینه در انتهای $3'-OH$ توالی CCA صورت می‌گیرد که اسیدهای آمینه اختصاصی به‌طریق آنزیمی به آن اتصال داده می‌شوند. شناسایی کدون با اتصال سه‌حرفی آنتی‌کدون به یک کدون سه-نوکلئوتیدی در mRNA صورت می‌گیرد. ایجا جفت‌باز بین کدون mRNA و سه‌حرفی‌های آنتی‌کدون، مکانیسم اصلی در تضمین تولی پیوند پپتیدی صحیح می‌باشد.

هر ملکول tRNA می‌تواند تنها یک اسید آمینه را انتقال دهد. با وجود این که تنها ۲۰ اسید آمینه در سنتز پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد، موجودات دارای زندگی آزاد، مجموع بزرگتری از ملکول‌های tRNA را سنتز می‌کنند. این نتیجه تکرارپذیری (داشتن بیش از یک کدون برای هر اسید آمینه) است. برای مثال، توالی ژنومی باکتری *Haemophililus influenzae* حاوی ژن‌هایی برای ۵۴ نوع tRNA است. میتوکندری‌ها تعداد بسیار کمتری ملکول tRNA سنتز می‌کنند. ملکول‌های tRNAای که یک اسید آمینه را می‌پذیرند، هم‌پذیرنده[1] نامید می‌شوند. یک tRNA که فنیل‌آلانین را می‌پذیرد، به صورت $tRNA^{Phe}$ نوشته می‌شود، د حالی که tRNA پذیرنده تیروزین به‌صورت $tRNA^{Tyr}$ نوشته می‌شود.

طول ملکول‌های tRNA شامل ۶۵ تا ۱۱۰ نوکلئوتید است که مرتبط با دامنه وزن ملکول ۲۲۰۰۰ تا ۳۷۰۰۰ می‌باشد. توالی‌های موجود در تمامی ملکول‌های tRNA (هزارا مورد شناخته شده‌اند) را می‌توان به‌واسطه ایجاد جفت باز واتسون-کریک در جهت تولی سه ساختمان ساقه-قوس، به صورت یک ساختمان دوم برگ‌شبدری مشترک آرایش دا توالی سه‌حرفی آنتی‌کدون در یکی از «بخش‌های» این ساختمان برگ‌شبدری وجود دار در حالی که ساقه گیرنده CCA در «ساقه» آن می‌باشد. این آرایش در ساختمان سه-بُعدی $tRNA^{Phe}$ حفظ می‌شود (شکل ۵۱-۲)، در حالی که هر کدام از ساقه‌های آنتی‌کدون پذیرنده در یک انتهای این ملکول L-شکل وجود دارند. ساختمان سوم این ملکول L شکل به واسطه پیوندهای هیدروژنی غیرواتسون-کریک به‌وجود می‌آید.

ملکول‌های tRNA حاوی نوکلئوتیدهای تغییریافته، برای مثال ۷-متیل‌گوانین د موقعیت ۴۶ در شکل ۵۰-۲، می‌باشند. نوکلئوتیدهای تغییریافته بر روی ساختمان و پایداری tRNA اثر می‌گذارند، ولی برای فعالیت پایه آن مورد نیاز نیستند. برای مثال، یک باز تغیی یافته در مجاورت آنتی‌کدون سبب افزایش کارایی شناسایی کدون می‌شود، ولی tRNA فاق این تغییر نیز همچنان می‌تواند به‌شکل صحیحی توسط ریبوزوم خوانده شود.

1. Isoacceptors

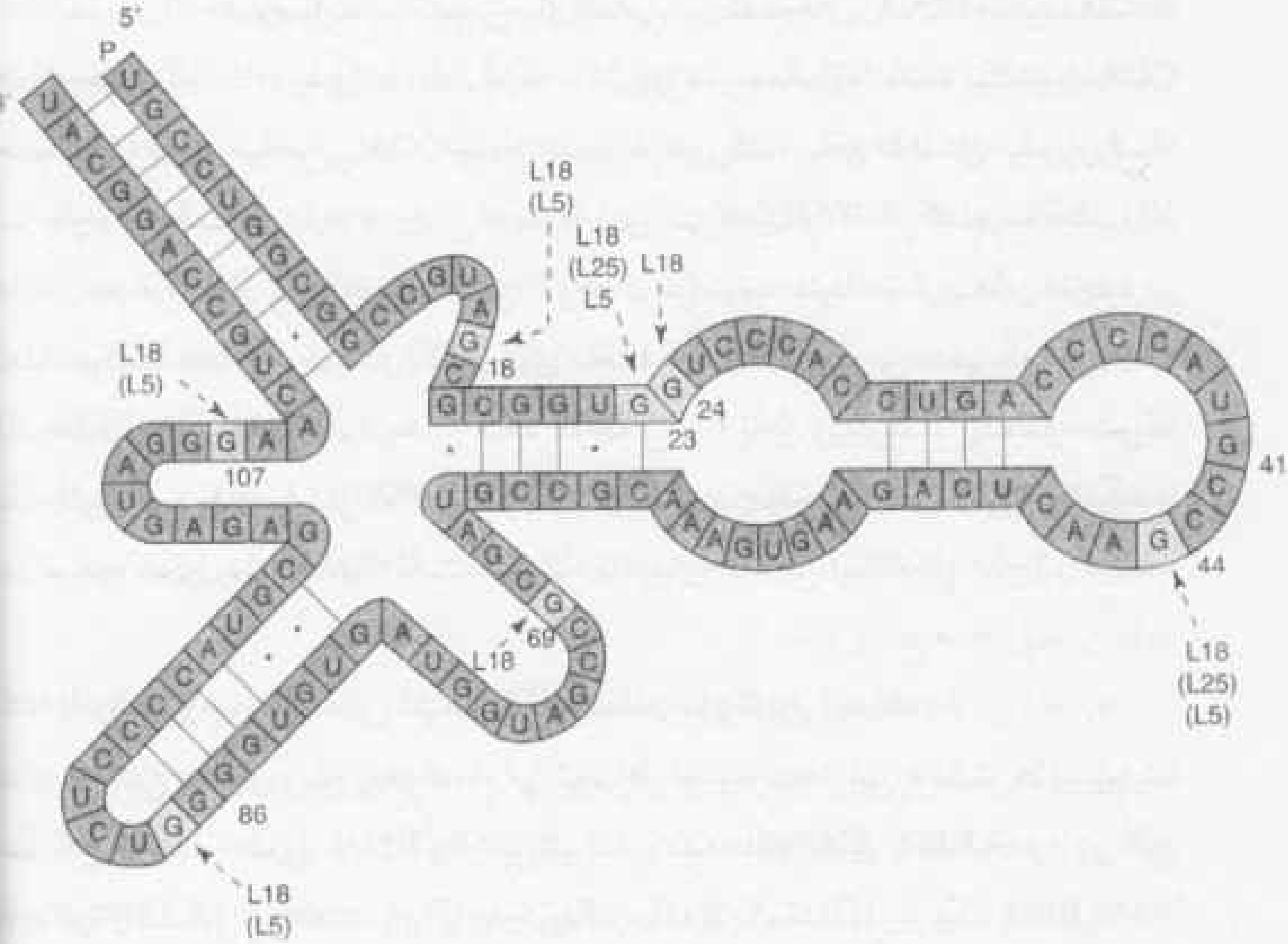
بسیاری از خصوصیات ساختمانی برای تمامی برگ‌شبدرهای tRNA مشترک هستند. هفت جفت باز ساقه پذیرنده اسید آمینه را تشکیل می‌دهند که به سه نوکلئوتید CCA ختم می‌شود. این سه‌حرفی CCA ایجاد جفت باز نمی‌کند. ساقه D یا دی‌هیدرواوراسیل سه یا چهار جفت باز دارد، در حالی‌که ساقه‌های آنتی‌کدون و T، هر کدام پنج جفت باز دارند. هم قوس آنتی‌کدون و هم قوس T، هفت نوکلئوتید دارند. تفاوت‌های موجود در تعداد نوکلئوتیدهای موجود در ملکول‌های مختلف tRNA در قوس متغیر آنها می‌باشد. اکثر ملکول‌های tRNA قوس‌های متغیر کوچکی با ۴ تا ۵ نوکلئوتید دارند، در حالی‌که بقیه دارای قوس‌های بلندتر ۱۳ تا ۲۱ نوکلئوتیدی هستند. موقعیت برخی از این نوکلئوتیدها در تمامی ملکول‌های tRNA ثابت هستند (کادرهای نارنجی تیره شکل ۵۰-۲ را ببینید).

RNA ریبوزومی قسمتی از دستگاه سنتز پروتئین است

سنتز پروتئین بر روی ریبوزوم‌ها انجام می‌شود. در اوکاریوت‌ها، این همایش‌های پیچیده متشکل از چهار ملکول RNA و ۸۲ پروتئین هستند؛ ملکول‌های RNA حدود دو سوم جرم ذره را تشکیل می‌دهند. زیر واحد کوچکتر، ذره ۴۰S، متشکل از یک ۱۸S RNA و ۳۳ پروتئین است. زیر واحد بزرگتر، ذره ۶۰S، شامل یک نسخه از هر سه ملکول RNA ۲۸S، ۵٫۸S و ۵S rRNA همراه با ۴۹ پروتئین می‌باشد. همایش کل تولید ریبوزوم ۸۰S می‌کند. ریبوزوم‌های پروکاریوتی کوچکتر هستند؛ زیرواحد ۳۰S یک ۱۶S rRNA و ۲۱ پروتئین دارد، در حالی‌که زیرواحد بزرگتر ۵۰S شامل یک نسخه از هر کدام از ملکول‌های ۵S rRNA و ۲۳S به همراه ۳۴ پروتئین مختلف است (ص ۲۹۷ را برای بحث ساختمان ریبوزوم ببینید).

rRNA حدود ۸۰٪ RNA سلولی را تشکیل می‌دهد و از نظر متابولیکی پایدار است. این پایداری برای عملکرد تکراری ریبوزوم لازم است و به‌واسطه همبستگی با پروتئین‌های ریبوزومی افزایش می‌یابد. ملکول‌های ۲۸S rRNA (۴۷۱۸ نوکلئوتیدی)، ۱۸S (۱۸۷۴ نوکلئوتیدی)، و ۵٫۸S (۱۶۰ نوکلئوتیدی) در هستک سنتز می‌شوند. ۵S rRNA (۱۲۰ نوکلئوتیدی) در هستک رونویسی نمی‌شود، بلکه از ژن‌های مجزایی در داخل نوکلئوپلاسم رونویسی می‌گردد (شکل ۵۳-۲). سه ملکول بزرگتر rRNA به‌صورت بخشی از یک زنجیر پلی‌نوکلئوتیدی بلند سنتز می‌شوند که به‌دنبال پردازش تولید این ملکول‌های مجزا را می‌کنند.

تغییرات نوکلئوتیدی در rRNA اساساً شامل متیلاسیون در جهت تولید ′۲-O- متیل‌ریبوز می‌باشد. متیلاسیون rRNA مستقیماً ارتباط با مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک در یک گونه بیماریزا دارد (ارتباط بالینی ۹-۲). تعداد کمی N^6- دی‌متیل‌آدنین‌ها در ۱۸S rRNA وجود دارند. ۲۸S rRNA حدود ۴۵ گروه متیل دارد و ۱۸S rRNA دارای ۳۰ گروه متیل است.



شکل ۵۳-۲ ساختمان دوم جفت - بازشد فرضی برای rRNA 5S. پیکان‌ها نواحی را نشان می‌دهند که توسط پروتئین‌ها در زیرواحد بزرگ ریبوزومی محافظت می‌شوند.

ارتباط بالینی ۹-۲

مقاومت استرپتوکوکی به اریترومایسین

باکتری‌هایی که در موارد بالینی و کشاورزی با آنتی‌بیوتیک‌ها مواجه می‌شوند، ممکن است نسبت به این داروها مقاومت پیدا کنند. این مقاومت می‌تواند حاصل یک جهش در DNA سلول هدف باشد که منجر به مقاومت زاده‌های آن می‌گردد. شکل دیگر ایجاد مقاومت که از نظر بالینی جدی‌تر است، تکثیر پلاسمید کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جمعیت باکتری‌ها می‌باشد. این پلاسمیدها ممکن است چندین شاخص مقاومت را حمل کنند و در یک زمان سبب بی‌فایدگی چندین آنتی‌بیوتیک شوند.

اریترومایسین سنتز پروتئین را از طریق اتصال به زیرواحد بزرگ ریبوزومی مهار می‌کند. *Staphylococcus aureus* می‌تواند به‌واسطه RNA متیلاز انتقالی توسط پلاسمید که یک آدنوزین موجود در rRNA 23S را به N^6– دی متیل‌آدنوزین تبدیل می‌کند، نسبت به اریترومایسین و آنتی‌بیوتیک‌های مشابه مقاوم گردد. از آنجایی‌که همین جایگاه ریبوزومی به لینکومایسین و کلیند-امایسین اتصال می‌یابد، این پلاسمید سبب مقاومت متقاطع نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها نیز می‌شود. سنتز این متیلاز توسط اریترومایسین القاء می‌شود.

یک میکروارگانیسم که تولید یک آنتی‌بیوتیک می‌کند، می‌بایست نسبت به آن ایمن باشد، در غیر این صورت توسط محصول سمی خود کشته خواهد شد. تولیدکننده اریترومایسین، یعنی *Streptococcus erythraeus*، خودش یک rRNA متیلاز دارد که بر روی همان جایگاه ریبوزومی عمل می‌کند که نوع تولیدی از *S.aureus* عمل می‌کند. کدام اول به‌وجود آمده است؟ احتمالاً بسیاری از ژن‌های مقاومت موجود در موجودات هدف از موجودات تولیدکننده به‌وجود آمده‌اند. در چندین مورد، توالی‌های DNA از ژن‌های مقاومت با همان ویژگی در موجودات تولیدکننده و هدف حفظ شده‌اند. لذا ممکن است به مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتقالی توسط پلاسمید به‌عنوان یک مورد «مهندسی ژنتیکی طبیعی» نگاه کنیم که به موجب آن DNA یک موجود زنده (برای مثال، تولیدکننده *Streptomyces*) در موجود دیگری (برای مثال، هدف *Staphylococcus*) بیان گردد.

RNA ریبوزومی جزء کاتالیتیک ریبوزوم است. ساختمان کریستالی اشعه X زیرواحد بزرگ یک نوع ریبوزوم باکتریایی نشان می‌دهد که جایگاه فعال سنتز پیوند پپتیدی تنها متشکل از RNA ۲۳S است؛ هر کدام از زنجیرهای اسید آمینه کاتالیتیک بالقوه آنقدر دور هستند که نمی‌توانند مستقیماً در واکنش شرکت کنند. واکنش‌های شیمیایی لازم برای سنتز پیوند پپتیدی توسط rRNA زیرواحد بزرگ کاتالیز می‌شوند (صفحه ۹۷ را برای بحث ملکول‌های RNA کاتالیتیک ببینید).

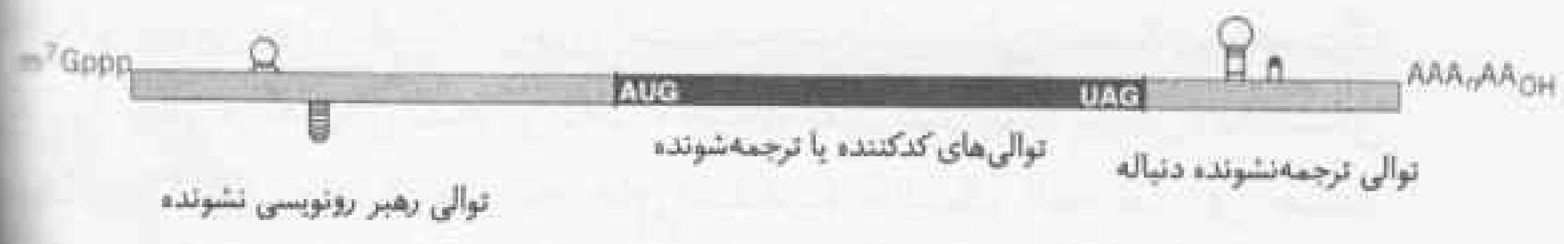
ملکول‌های RNA پیک اطلاعات مربوط به ساختمان اول پروتئین‌ها را حمل می‌کنند

ملکول‌های mRNA حاملین مستقیم اطلاعات ژنتیکی از ژنوم به ریبوزوم‌ها هستند. هر mRNA اوکاریوتی **منوسیسترونی** است، یعنی حاوی اطلاعات مربوط به تنها یک زنجیر پلی‌پپتیدی می‌باشد. در پروکاریوت‌ها، گونه‌های mRNA اغلب **پلی‌سیسترونی** هستند که بیش از یک پروتئین را کد می‌کنند. فنوتیپ و وضعیت عملکردی سلول مستقیماً با محتوای mRNA آن ارتباط دارد.

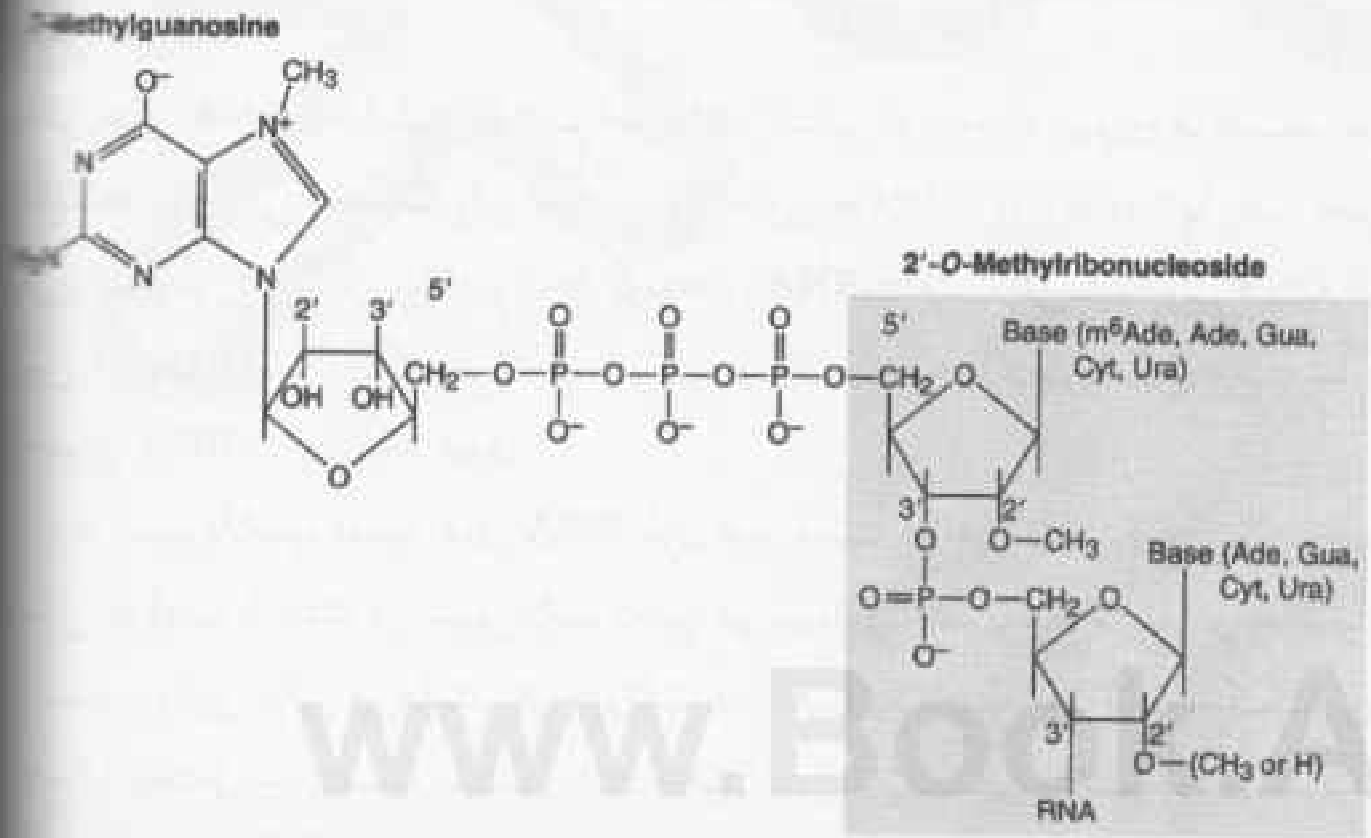
در سیتوپلاسم، ملکول‌های RNA طول عمر نسبتاً کوتاهی دارند. برخی سنتز و به شکل غیرفعال یا نهفته در سیتوپلاسم ذخیره می‌شوند و آماده پاسخ سریع در زمان نیاز به سنتز پروتئین باقی می‌مانند. در حیوانات مختلف، بلافاصله بعد از تخم‌گذاری، تخمک متحمل سنتز سریع پروتئین بدون وجود رونویسی در سیتوپلاسم خود می‌شود که نشان می‌دهد mRNA و ریبوزوم‌ها از قبل در سیتوپلاسم وجود دارند.

ملکول‌های mRNA اوکاریوتی خصوصیات ساختمانی بی‌همتایی دارند (شکل ۵۴-۲). به دلیل این که اطلاعات موجود در mRNA در داخل توالی خطی نوکلئوتیدهای آن وجود دارند، یکپارچگی این توالی فوق‌العاده مهم می‌باشد. هر نوع ازدست‌رفتن یا تغییر نوکلئوتیدها سبب تغییر ساختمان در حال ترجمه می‌شود. همچنین لازم است ترجمه mRNA بر روی ریبوزوم‌ها از توالی اختصاصی آغاز شده و در توالی اختصاصی به پایان برسد. در اوکاریوت‌ها، یک ساختمان «کلاهک[1]» در انتهای ′5 یک mRNA، در تعیین محل شروع ترجمه نقش دارد. کلاهک‌های موجود در ملکول‌های mRNA اوکاریوتی حاوی یک پیوند فسفودی‌استری معکوس، یک باز متیله متصل به mRNA از طریق اتصال دی‌استر ′5، ′5-تری‌فسفات، به‌جای اتصال معمول ′3، ′5-فسفودی‌استر، می‌باشد. این کلاهک متصل به اولین نوکلئوتید رونویسی‌شده، معمولاً یک پورین ′2-O-متیله، می‌باشد (شکل ۵۵-۲). بعد از این کلاهک، یک توالی ترجمه‌نشونده یا «رهبر[2]» وجود دارد. ترجمه از محل کدون شروع، اکثراً AUG، آغاز می‌شود و در طول توالی کدکننده ادامه می‌یابد. در انتهای توالی کدکننده، یک توالی خاتمه پیام اتمام تولید پلی‌پپتید و آزادسازی از ریبوزوم را صادر

1. Cap 2. Leader



شکل ۵۴-۲ ساختمان عمومی یک mRNA اوکاریوتی. در انتهای ′۵ یک کلاهک مسدودکننده و به‌دنبال آن یک رهبر ترجمه‌نشونده حاوی یک توالی پروموتری وجود دارد. ناحیه کدکننده معمولاً با کدون شروع AUG آغاز می‌گردد و تا توالی خاتمه ترجمه UAG، UAA یا UGA ادامه می‌یابد. به‌دنبال این توالی یک دنباله ترجمه‌نشونده و یک دم‌پلی(A) در انتهای ′۳ وجود دارد.



شکل ۵۵-۲ دیاگرام ساختمان «کلاهک» یا انتهای ′۵ مسدودشده در mRNA. ۷-متیل‌گوانوزین معکوس‌شده تا یک اتصال ′۵- فسفات به ′۵- فسفات با اولین نوکلئوتید mRNA به‌وجود آورد. این نوکلئوتید اغلب یک پورین متیله است.

می‌کند. در ادامه یک توالی ترجمه‌نشونده دوم، یا «دنباله[1]» وجود دارد که به یک رشته ۲۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید آدنینی، تحت عنوان **دم پلی(A)**، ختم می‌شود که انتهای ′۳ ملکول mRNA را می‌سازد.

کلاهک ′۵ یک اثر مثبت بر روی شروع ترجمه پیام دارد. طی شروع ترجمه mRNA ساختمان کلاهک توسط یک عامل شروع اختصاصی مورد شناسایی قرار می‌گیرد (ص ۳۰۳). توالی پلی (A) بر روی پایداری mRNA تأثیر دارد؛ تخریب یک mRNA عموماً با کوتاه‌شدن دم پلی (A) آغاز می‌شود.

میتوکندری‌ها گونه‌های بی‌همتایی از RNA را دارند

میتوکندری‌ها (mt) دستگاه سنتز پروتئین خود را دارند که شامل ریبوزوم‌ها، tRNAs و mRNAs می‌باشد. ملکول‌های rRNA میتوکندریایی، شامل ۱۲S و ۱۶S، و همچنین ۲۲ ملکول اختصاصی tRNA و ۱۳ ملکول اختصاصی mRNA از DNA میتوکندریایی (mtDNA) رونویسی می‌شوند؛ برخی از این ملکول‌های mRNA پروتئین‌های زنجیر انتقال الکترون

1. Trailer

و ATP سنتاز را کد می‌کنند. توجه داشته باشید که تعداد کمتری ملکول tRNA میتوکندریایی نسبت به انواع tRNA پروکاریوتی یا سیتوزولی وجود دارد؛ عموماً تنها یک نوع tRNA میتوکندریایی برای هر اسید آمینه وجود دارد. ملکول‌های mtRNA حدود ۴٪ RNAهای کل سلولی را شامل می‌شوند. این ملکول‌ها توسط RNA پلیمراز اختصاصی - میتوکندری رونویسی می‌شوند و از یک جفت پیش‌ساز RNA پردازش می‌گردند که حاوی توالی‌های tRNA و mRNA می‌باشند. بیان ژنوم‌های هسته و میتوکندریایی شدیداً هماهنگ می‌باشد. بیشتر آنزیم‌های آمینو آسیله‌کننده برای ملکول‌های tRNA میتوکندریایی و تمامی پروتئین‌های ریبوزومی میتوکندریایی توسط ژن‌های هسته کد، در سیتوزول ترجمه و به داخل میتوکندری‌ها انتقال داده می‌شوند. بازهای تغییریافته موجود در tRNA میتوکندریایی توسط آنزیم‌هایی سنتز می‌شوند که خود در DNA هسته کد می‌گردند.

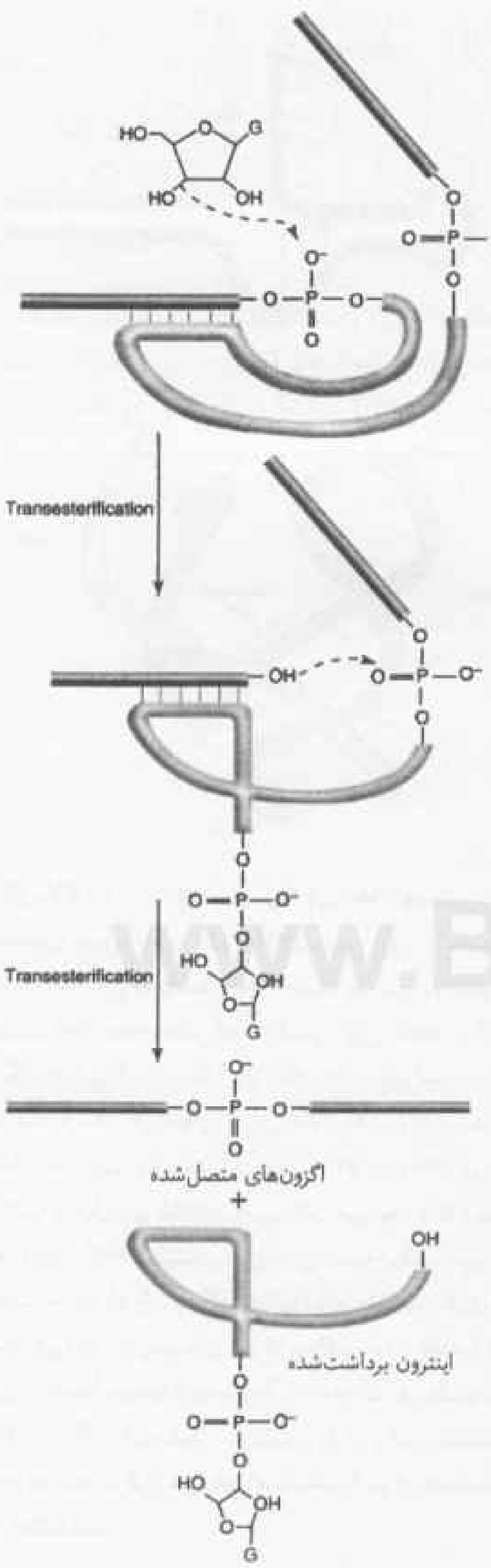
RNA در ذرات ریبونوکلئوپروتئین

سایر ملکول‌های RNA پایدار را می‌توان در هسته، سیتوزول، و میتوکندری‌ها یافت. این ملکول‌های RNA کوچک به صورت ذرات ریبونوکلئوپروتئینی [1] (RNP)، با یک یا چند زیر واحد پروتئینی اتصال‌یافته، فعالیت می‌کنند. گونه‌های RNP مختلف در پردازش RNA، انتقال RNA، کنترل ترجمه، و شناسایی پروتئین‌ها به‌واسطه انتقال نقش دارند. نقش‌های واقعی این گونه‌ها که شناخته شده‌اند، به شکل کامل‌تری در بحث حوادث متابولیکی اختصاصی به شکل کامل‌تری شرح داده می‌شوند.

RNA کاتالیتیک: ریبوزیم‌ها

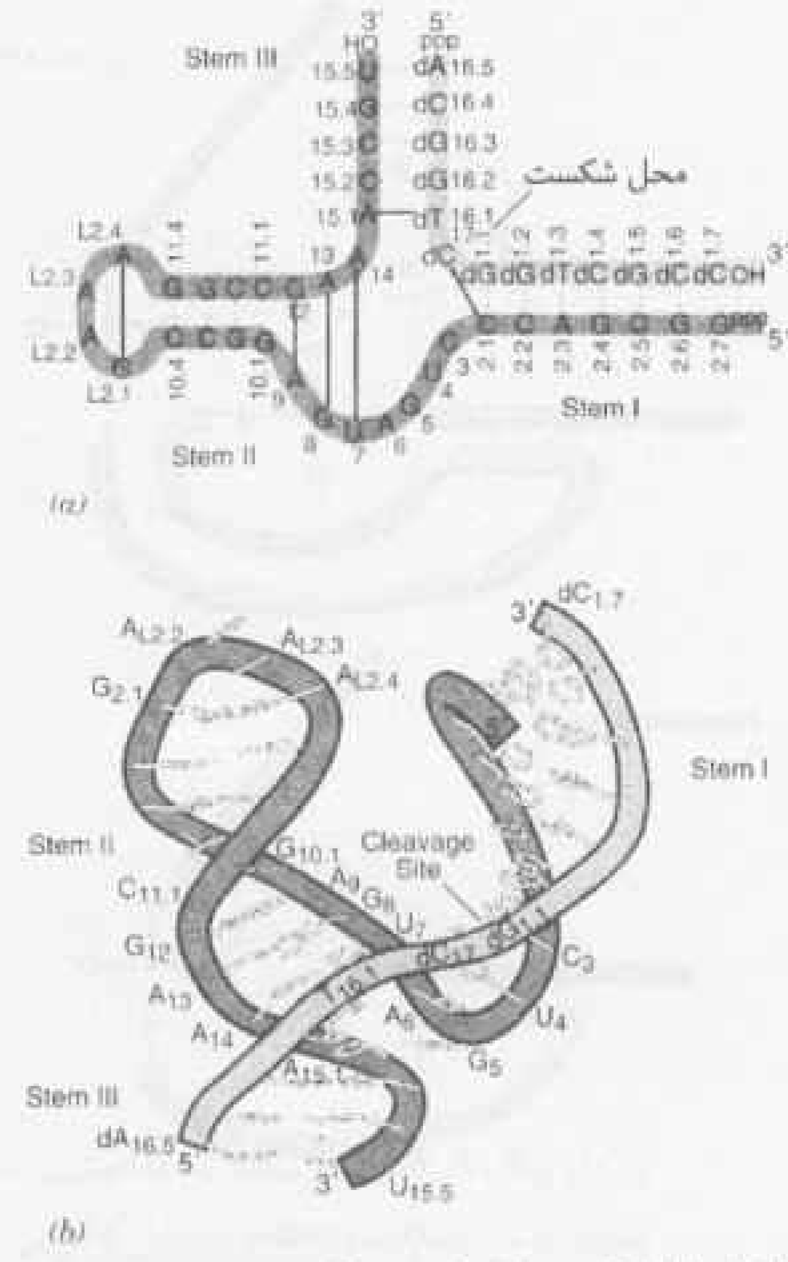
RNA می‌تواند یک آنزیم باشد. در چندین مورد، جزء RNA یک ذره ریبونوکلئوپروتئینی، زیرواحد دارای فعالیت کاتالیتیکی آنزیم است. در موارد دیگر، واکنش‌های کاتالیتیک را می‌توان توسط RNA در آزمایشگاه و در غیاب هر پروتئینی انجام داد. آنزیم‌هایی که زیرواحدهای RNAی آنها واکنش‌های کاتالیتیک را انجام می‌دهند را ریبوزیم گویند. پنج کلاس ریبوزیم‌ها وجود دارند. سه مورد از این گونه‌های RNA واکنش‌های خود پردازش [2] را انجام می‌دهند، در حالی که موارد دیگر، شامل ریبونوکلئاز P (RNase P) و rRNA، کاتالیست‌های واقعی هستند که سوبستراهای مجزایی دارند.

در تک یاخته مژکدار *Tetrahymena thermophila*، طی یک واکنش چند مرحله‌ای یک اینترون از پیش‌ساز tRNA برداشت می‌شود (شکل ۵۶-۲). یک نوکلئوزید یا نوکلئوتید گوانینی با اتصال فسفودی‌استری اینترون - اگزون واکنش نموده و اگزون دهنده را از اینترون جدا می‌کند. این واکنش، یک ترانس‌استریفیکاسیون، توسط خود اینترون تاشده تسریع می‌گردد. سپس اگزون دهنده حمله مشابهی به پیوند فسفودی‌استری اگزون - اینترون در



شکل ۵۶-۲ مکانیسم خود-اسپلایسینگ پیش‌ساز rRNA تتراهایمنا. دو اگزون rRNA به‌ترتیب با کادرهای سفید و سایه‌دار مشخص شده‌اند. فعالیت کاتالیتیک در اینترون وجود دارد که سیاه است. این فعالیت اسپلایسینگ نیاز به یک نوکلئوزید یا نوکلئوتید گوانینی دارد.

1. Ribonucleoprotein 2. Self-processing



شکل ۵۷-۲ ساختمان «سرچکشی» RNA ویروسی. (a) ساختمان «سرچکشی» یک RNA ویروسی خود - شکننده. ملکول ساختگی به واسطه ایجاد جفت باز بین دو ملکول مجزای RNA به‌وجود می‌آید. شکستن توالی RNA در این جایگاه که با پیکان در رشته بالا نشان داده شده است. نیاز به جفت بازشدن آن با توالی پایینی ملکول دارد. نوکلئوتیدهای داخل کادر یک توالی مشترک هستند که در RNA خود - شکننده ملکول‌های RNA ویروسی یافت می‌شود. (b) تا شدن سه -بُعدی RNA کاتالیتیکی سرچکشی. ستاره موقعیت پیوند شکسته‌شده و M یک جایگاه اتصالی برای یک یون فلزی را نشان می‌دهد. ماربیچ‌های II و III متراکم‌شده تا تولید یک ماربیچ واضحاً پیوسته کنند، در حالی‌که تعاملات غیرواتسون - کریک، بازهای غیرمکمل سرچکشی را در یک ساختمان «پیچ اوریدینی» قرار می‌دهد که یکسان با مورد یافت‌شده در tRNA است.

انتهای پذیرنده اینترون انجام می‌دهد. اینترون‌های این نوع (اینترون‌های گروه I) در انوا مختلفی از ژن‌ها در میتوکندری‌های قارچی، در باکتری‌ها و باکتریوفاژ T4 یافت می‌شوند گرچه این اینترون‌ها در آزمایشگاه، به دلیل انجام تنها یکبار چرخه واکنش، به عنوان آنزیم‌های واقعی عمل نمی‌کنند، ولی آنها را می‌توان طوری ساخت که در شرایط اختصاصی واکنش‌های کاتالیتیک را انجام دهند.

گروه II اینترون‌های خود-اسپلایسینگ[1] در پیش‌سازهای RNA میتوکندریایی مخمرها و سایر قارچ‌ها وجود دارند. گرچه این ملکول‌های RNA خود-اسپلایس هستند، شباهت‌های زیادی بین این واکنش و برداشت اینترون‌ها از پیش‌سازهای mRNA طی پردازش وجود دار

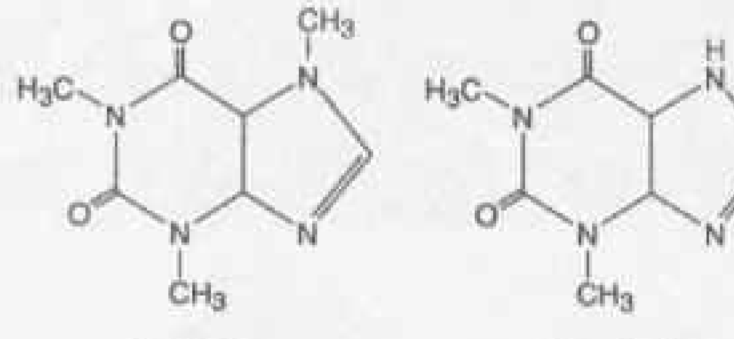
گروه III ملکول‌های RNA خود- شکننده[2] در ملکول‌های RNA ژنومی چندین ویروس یافت می‌شود. این ملکول‌های RNA در هنگام تولید ملکول‌های RNA ژنومی واحد از پیش‌سازهای بزرگتر، خود را می‌شکنند. ساختمان سه-بُعدی ریبوزیم سرچکشی[3] عضوی از این کلاس سوم، تعیین شده است (شکل ۵۷-۲). هرچند چرخه کاتالیتیک کاملا مشخص نشده است، گروه آمینوی یک باز سیتوزین نقش اساسی را در این واکنش شکست بازی می‌کند. فسفات پیوند شکسته‌شده در موقعیت ′۳ -هیدروکسیل محصول RNA باقی می‌ماند. یک RNA خود- شکننده یافت‌شده در ویروس قمری کوچک[4]، یا ویروس هپاتیت دلتا، در هپاتیت عفونی جدی انسان نقش دارد. تمامی ملکول‌های خود- شکنند فوق را می‌توان طوری ساخت که به‌عنوان کاتالیست‌های واقعی در بدن و در آزمایشگا عمل کنند (یعنی، نوسازی متعدد را نشان دهند).

نوع چهارم ریبوزیم، ریبونوکلئاز P، یک پروتئین و یک جزء RNA دارد. این ریبوزی همانند یک آنزیم واقعی در سلول‌ها عمل نموده و با شکستن پیش‌سازهای tRNA، انتهای ′۵ بالغ ملکول‌های tRNA را تولید می‌کند. RNase P به جای استفاده از ایجاد جفت باز گسترده برای اتصال به RNA سوبسترا به ریبوزیم، ساختمان‌های ثابت همراه با پیش‌سازهای tRNA (برای مثال، ساقه پذیرنده و توالی CCA) را شناسایی می‌کند. برخلاف محصولات ملکول‌های RNA سرچکشی و مشابه، محصول شکست یک ′۵ -فسفات دارد. در تمامی این حوادث، ساختمان RNA کاتالیتیک برای کاتالیز ضروری است.

بالاخره، ساختمان کریستالوگرافی اشعه X یک ریبوزوم باکتریایی نشان می‌دهد که این نیز یک ریبوزیم است. جایگاه فعال ریبوزوم برروی زیرواحد ۵۰S قرار دارد. هیچ گروه عاملی از پروتئین به اندازه کافی به محل کاتالیز تشکیل پپتید نزدیک نیست. در عوض ریشه‌های موجود در داخل ۲۳S RNA به انتقال یک یون هیدروژن در هنگام سنتز پیوند پپتیدی کمک می‌کنند.

کشف کاتالیز توسط RNA به میزان زیادی مفاهیم تکامل بیوشیمیایی و دامنه شیمی سلولی مجاز[5] را تغییر داده است. اول، هم اکنون می‌دانیم که RNA می‌تواند هم به‌عنوان

1. Self-splicing 2. Self-cleaving 3. Hammerhead 4. Small satellite virus 5. Allowable cellular chemistry



Caffeine Theophylline

شکل ۵۸-۲ **ساختمان تئوفیلین و کافئین**. با وجود این که این ترکیبات تنها از نظر یک گروه متیل با یکدیگر اختلاف دارند، یک RNA سنتتیک اختصاصی می‌تواند ۱۰۰۰۰ برابر محکم‌تر از کافئین به تئوفیلین اتصال یابد.

کاتالیست و هم به عنوان یک حامل اطلاعات ژنتیکی عمل کند. این موضوع سبب طرح این احتمال شده است که ابتدایی‌ترین موجودات زنده متکی بر RNA بوده‌اند و DNA و پروتئین بعداً به‌وجود آمده‌اند. این مدل را گاهی «دنیای RNA[1]» می‌گویند. دوم، می‌دانیم که بسیاری از ویروس‌ها، شامل عوامل بیماریزای انسانی، از اطلاعات ژنتیکی RNA استفاده می‌کنند. نشان داده شده است که برخی از این ملکول‌های RNA کاتالیتیک هستند. لذا RNA کاتالیتیک فرصت‌هایی را برای کشف عوامل دارویی RNA- محور به‌وجود می‌آورد. سوم، بسیاری از حوادث پردازش اطلاعات در اسپلایسینگ RNA نیاز به اجزاء RNA دارد. این ملکول‌های RNA نیز ممکن است به عنوان کاتالیست عمل کنند.

ملکول‌های RNA می‌توانند به سایر ملکول‌ها اتصال یابند

توجه به دنیای RNA، براساس تعداد زیاد توالی‌های بالقوه (۴^N) که می‌توان در صورت قرارگیری اتفاقی A، C، G یا U در هر موقعیت N در یک اسید نوکلئیک ساخت، منجر به موج جدیدی از «بیوشیمی ترکیبی[2]» شده است. مجموعه‌ای از ملکول‌های اسید نوکلئیک به طول ۲۵ نوکلئوتید تصادفی که به طریق شیمیایی سنتز شده‌اند، $۱۰^{۱۵} = ۴^{۲۵}$ عضو بالقوه خواهند داشت. انتظار می‌رود که ملکول‌های متفاوت موجود در این مجموعه بزرگ ملکول‌های RNA به مجموعه مشابهاً بزرگی از اشکال تا شوند. تعداد زیاد اشکال ملکولی به معنی این است که برخی اعضاء این مجموعه باید بتوانند اتصال محکم و اختصاصی با لیگاندها برقرار کنند، همانند اینترون‌های گروه I که به‌طور اختصاصی به نوکلئوتیدهای گوانینی اتصال می‌یابند. این ملکول‌های RNA اتصالی را **آپتامر**[3] گویند. با وجود این که یک ملکول واحد برای مطالعه در جمعیت ابتدایی بسیار کم است، RNA آپتامر را می‌توان در آزمایشگاه انتخاب و ترجیحاً همانندسازی نمود. برای مثال، از یک جمعیت پیچیده ملکول‌های RNA، یک RNA انتخاب شد که قادر به تمایز تئوفیلین از کافئین بود (شکل ۵۸-۲). تئوفیلین در درمان آسم مزمن استفاده می‌شود، ولی لازم است برای اجتناب از عوارض جانبی، میزان آن بدقت کنترل شود. پایش غلظت تئوفیلین با آزمون مرسوم آنتی‌بادی- محور مشکل است، زیرا کافئین و تئوفیلین تنها از نظر یک گروه متیل با یکدیگر اختلاف دارند. آنتی‌بادی‌های ضدتئوفیلین واکنش متقاطع قابل توجهی را با کافئین نشان می‌دهند. ملکول‌هایی از RNA یافت شده‌اند که به تئوفیلین ۱۰۰۰۰ برابر محکم‌تر از کافئین اتصال می‌یابند. از این فناوری در انتخاب روش‌هایی برای شناسایی ریبوزیم‌های جدید سنتتیک و ملکول‌های RNA درمانی بالقوه استفاده شده است.

ملکول‌های RNA ترجمه را کنترل می‌کنند

برای ترجمه یک mRNA نیاز به اتصال آن به ریبوزوم و حرکت نسبت به ریبوزوم می‌باشد. کنترل کارایی این فرایندها امکان کنترل ترجمه را فراهم می‌سازد. یکی از راه‌ها برای این

1. RNA world 2. Combinatorial biochemistry 3. Aptamer

منظور، از طریق جایگاه آپتامری موجود در mRNA می‌باشد. برخی ملکول‌های mRNA باکتریایی به‌طور طبیعی حاوی جایگاه‌های آپتامری در ناحیه ′5-ترجمه‌نشونده ملکول mRNA هستند. این جایگاه‌ها به لیگاندهای اختصاصی نظیر اسیدهای آمینه، بازهای پورینی، گلوکزآمین ۶-فسفات، یا کوفاکتورهای آنزیمی اتصال می‌یابند که محصولات مسیری هستند که آنزیم‌های مربوط به آنها توسط mRNA کد می‌شود. اتصال لیگاند مانع ترجمه این mRNA و بنابراین کنترل سنتز پروتئین‌هایی می‌شود که مسئول مسیر بیوسنتتیک آن لیگاند هستند. این شکلی از تنظیم نوع سیس می‌باشد، زیرا کنترل توسط ملکولی حاوی جایگاه آپتامری به انجام می‌رسد.

RNA دو-رشته یک تنظیم‌کننده منفی بیان ژن اوکاریوتی از نوع ترانس، یعنی بر روی ملکول دیگر، است. برای مثال، RNA دو-رشته یک ترکیب واسط لازم در همانندسازی برخی RNA ویروس‌ها است. به عنوان یک دفاع، میزبان این RNA دو-رشته را در جهت تولید ملکول‌های RNA تک-رشته با طول حدود ۲۳ نوکلئوتید پردازش می‌کند. این ملکول‌های RNA، تحت عنوان ملکول‌های ریز RNA[1] (miRNA)، با ملکول‌های mRNA اختصاصی ایجاد جفت باز می‌کنند و یا ترجمه آنها را متوقف می‌سازند و یا تخریب آنها را آغاز می‌کنند (ص. ۳۹۵). کارهای بعدی بر روی ملکول‌های miRNA و ملکول‌های RNA مهاری کوچک[2] (siRNAs) که ارتباط نزدیکی با آنها دارند، نشان داده‌اند که این گونه‌ها تنظیم‌کننده‌های مهم بسیاری از محصولات ژنی شامل انواع درگیر در بدخیمی هستند (ارتباط بالینی ۸-۵ را ببینید).

واژه‌های کلیدی

عقیده بنیادی	دم پلی(A)	ایجاد ابرفنر	بعد از رونویسی
DNA	پلی‌نوکلئوتید	تلومر	tRNA
همانندسازی	تراکم بازی	کروموزوم	rRNA
رونویسی	ماریپچ دوتایی	توپوایزومراز	منوسیسترونی
آدنین	جفت باز واتسون-کریک	کروماتین	mRNA
سیتوزین	مکمل‌بودن	سانترومر	پلی‌سیسترونی
داکسی‌ریبوز	دناتوراسیون	هیستون	کلاهک mRNA
گوانین	رناتوراسیون	نوکلئوزوم	ذره ریبونوکلئوپروتئینی
نوکلئوزید	درجه حرارت ذوب‌شدن	اگزون	ریبوزیم
نوکلئوتید	هیبریدیزاسیون	اینترون	آپتامر
تیمین	A-DNA	DNA تکراری	میکرو RNA
اوراسیل	B-DNA	اسپلایسینگ	RNA مهاری کوچک
فسفودی‌استر	Z-DNA		

1. MicroRNA 2. Small inhibitory RNAs



۳



پروتئین ها I: ترکیب و ساختمان

مفاهیم کلیدی

- دو نوع اسید آمینه در پلی‌پپتیدها وجود دارند: اسیدهای آمینه معمول و مشتقات اسیدهای آمینه. اسیدهای آمینه معمول یک اتم کربن مرکزی دارند که به آن یک گروه آمینو، یک گروه اسید کربوکسیلیک، یک اتم هیدروژن و یک گروه زنجیر- جانبی اتصال دارد.
- اسیدهای آمینه موجود در زنجیرهای پلی‌پپتیدی از طریق یک پیوند پپتیدی به یکدیگر متصل می‌باشند؛ این پیوند گروه α- اسید کربوکسیلیک یک اسید آمینه را به گروه α- آمینو اسید آمینه دیگر متصل می‌کند.
- اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها خصوصیات اسید- بازی و باری مرتبط دارند که فعالیت بیولوژیکی آنها را تعیین می‌کند و برای شناسایی و تخلیص مورد استفاده قرار می‌گیرند.
- یک پروتئین براساس ساختمان دوم، سوم و چهارم تعریف می‌شود. ساختمان مارپیچی α و ساختمان β از جمله ساختمان‌های دوم پایداری هستند که در داخل پروتئین‌های تاشده وجود دارند.
- دومن‌های مربوط به پروتئین‌های کروی از موتیف‌های ساختمانی و قولدهای مشخص به‌وجود می‌آیند.
- پروتئین‌های موجود در سلول‌ها به‌صورت کمپلکس‌هایی وجود دارند که به‌صورت شبکه‌هایی سازماندهی می‌شوند و در اینتراکتوم‌ها شرکت می‌کنند.
- برخی پروتئین‌ها ذاتاً بی‌ساختمان هستند که برای فعالیت‌های بیولوژیکی آنها لازم است.
- پروتئین‌های غیرکروی شامل پروتئین‌های رشته‌ای نظیر کلاژن می‌باشند که توالی اسید آمینه‌ای تکراری و هندسه مارپیچی غیر معمول و میله‌ای- شکل دارند.
- یک پروتئین تحت فشارهای کینتیکی و کنترل نیروهای غیرکووالان، به کونفورماسیون با کمترین انرژی آزاد گیبس خود تا می‌شود.
- ساختمان‌های پروتئینی تاشده پویا هستند که در آنها اتم‌ها حول یک موقعیت میانه در حال نوسان و چرخش می‌باشند.
- پروتئین‌ها براساس بار و اندازه توسط تکنیک‌های مختلفی تخلیص و مورد شناسایی قرار می‌گیرند. ساختمان پروتئین با تکنیک‌های طیفی، نوری و انکسار اشعه-X مشخص می‌گردد.
- تکنیک‌های پروتئومیک بیان هزاران پروتئین در داخل یک سلول یا بافت را با یک آزمون تعیین می‌کنند.

۱-۳ • نقش‌های عملکردی پروتئین‌ها در انسان

در پستانداران پروتئین‌ها فعالیت‌های پویا و ساختمانی متنوعی را برعهده دارند. فعالیت‌های پویا شامل کاتالیز تغییرات شیمیایی، انتقال، کنترل متابولیکی، و انقباض می‌باشند. در اجرای نقش‌های ساختمانی خود، پروتئین‌ها ماتریکس استخوان و بافت همبند را به‌وجود می‌آورند، ساختمان‌ها را ایجاد می‌کنند و به انسان شکل می‌دهند. حدود ۲۵,۰۰۰ ژن انسانی از طریق اسپلایسینگ متفاوت RNA و تغییرات بعد از ترجمه پروتئین‌های ترجمه‌شده، تولید یک میلیون پروتئین بی‌همتا می‌کنند. تعداد پروتئین‌هایی که به‌طور همزمان در یک سلول انسانی بیان می‌شوند، از ۲۰,۰۰۰ تا ۵۰,۰۰۰ متفاوت است.

آنزیم‌ها پروتئین‌هایی هستند که واکنش‌های شیمیایی را کاتالیز می‌کنند. تقریباً تمامی هزاران واکنش شیمیایی که در موجودات زنده انجام می‌شوند، نیاز به یک کاتالیست آنزیمی اختصاصی دارند تا انجام این واکنش‌ها با سرعتی که سازگار با حیات است را تضمین کنند. خصوصیت هر سلول متکی بر شیمی خاص آن است که توسط ترکیب آنزیمی اختصاصی آن مشخص می‌شود که خود فنوتیپ سلولی را تعیین می‌کند. بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی حاصل تغییر میزان تولید آنزیم‌ها یا تغییرات اختصاصی در توالی اسید آمینه‌ای آنها می‌باشند. حدود یک سوم ژن‌های انسانی، پروتئین‌های آنزیمی را کد می‌کنند.

فعالیت دیگر پروتئین‌ها، انتقال مواد است. نمونه‌هایی که در این کتاب به جزئیات آنها پرداخته می‌شود، شامل هموگلوبین و میوگلوبین می‌باشند که به ترتیب اکسیژن را در خون انتقال داده و در عضله ذخیره می‌کنند. پروتئین‌ها به لیپیدها، متابولیت‌ها، هورمون‌های استروئیدی، ویتامین‌ها، ملکول‌های پیام‌رسان و مواد معدنی موجود در خون اتصال یافته و آنها را از محل سنتز به محل فعالیت یا حذف انتقال می‌دهند. بسیاری از داروها و ترکیبات سمی به شکل متصل به پروتئین در خون انتقال داده می‌شوند. پروتئین‌های دیگر در داخل سلول ترکیبات و همچنین سایر پروتئین‌ها را به محل فعالیت انتقال می‌دهند. پروتئین‌ها در حمل ترکیبات و پیام‌ها در عرض غشاء پلاسمایی سلول‌ها و غشاء‌های مربوط به اندامک‌ها نقش دارند. پروتئین‌ها همچنین در مکانیسم‌های انقباض همکاری دارند. میوزین و اکتین در انقباض عضلانی فعالیت دارند و مسئول ایجاد تغییر در شکل سلول هستند.

پروتئین‌هایی نظیر ایمونوگلبولین‌ها، پروتئین‌های مکمل، و اینترفرون نقش حفاظتی دارند و سبب حفاظت در برابر عفونت‌های باکتریایی و ویروسی می‌شوند. پروتئین‌های انعقادی منجر به خاتمه خونریزی در هنگام آسیب سیستم عروقی می‌گردند.

بسیاری از پروتئین‌ها ساختمان پروتئینی یا پپتیدی دارند. انسولین، تیروتروپین، سوماتوتروپین (هورمون رشد)، پرولاکتین، هورمون تولیدکننده جسم زرد و هورمون محرک فولیکولی، پروتئینی هستند. بسیاری از هورمون‌های پلی‌پپتیدی وزن ملکولی پایینی (کمتر از ۵ kDa) دارند و پپتید نامیده می‌شوند. به‌طور کلی، واژه **پروتئین** برای ملکول‌هایی مورد استفاده قرار می‌گیرد که بیش از ۵۰ اسید آمینه دارند و **پپتید** برای مواردی است که کمتر

... اسید آمینه دارند. هورمون‌های پپتیدی مهم شامل هورمون آدرنوکورتیکوتروپیک، هورمون ضد ادراری، گلوکاگون و کلسی‌تونین می‌باشند.

پروتئین‌ها رونویسی و ترجمه ژن را کنترل و تنظیم می‌کنند. اینها شامل پروتئین‌های هیستونی که ارتباط نزدیکی با DNA دارند، فاکتورهای رونویسی سرکوبگر و فزاینده رونویسی، پروتئین‌های تنظیم‌کننده DNA در جهت تسریع یا مهار بیان ژن، پروتئین‌های مسئول رونویسی DNA و RNA، و اجزاء ذرات RNA ناهمگن هسته‌ای و ریبوزوم‌ها هستند.

پروتئین‌های ساختمانی نقش «آجر و ملاط» را بازی می‌کنند. این پروتئین‌ها شامل کلاژن و الاستین هستند که ماتریکس استخوان و لیگامان‌ها را به‌وجود آورده و قدرت ساختمانی و خاصیت ارتجاعی اعضاء سیستم عروقی را به‌وجود می‌آورند. توبولین و اکتین پروتئین‌هایی هستند که به‌صورت رشته‌هایی از میکروتوبول‌ها پلیمریزه می‌شوند که اسکلت سلولی هر سلولی را ایجاد می‌کنند.

برای شناخت عملکرد طبیعی و پاتولوژی پستانداران لازم است شناخت خوبی از خصوصیات پروتئین‌ها داشته باشیم.



شکل ۱-۳ اطلاعات ژنتیکی از یک توالی DNA به یک توالی mRNA رونویسی شده که بعداً به توالی اسید آمینه‌ای یک پروتئین ترجمه می‌شود.

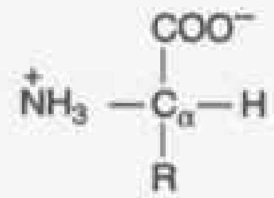
۲-۳ • ترکیب اسید آمینه‌ای پروتئین‌ها

تمامی انواع مختلف پروتئین‌ها، پلیمرهایی از تنها ۲۱ اسید آمینه هستند. **اسیدهای آمینه معمول**[1] شامل اسیدهای آمینه‌ای هستند که برای آنها حداقل یک کدون در فرهنگ توارث وجود دارد. رونویسی و ترجمه رمز DNA منجر به قرارگیری اسیدهای آمینه در یک توالی خطی اختصاصی مشخص یک پروتئین می‌شود (شکل ۱-۳). بسیاری از پروتئین‌ها همچنین حاوی **اسیدهای آمینه مشتق‌شده**[2] هستند که معمولاً در اثر تغییر آنزیمی یکی از اسیدهای آمینه معمول بعد از قرارگیری آن در داخل یک پروتئین، تولید می‌شوند. سیستین (ص ۱۰۷)، دسموزین و ایزودسموزین موجود در الاستین، هیدروکسی‌پرولین و هیدروکسی‌لیزین موجود در کلاژن، γ-کربوکسی‌گلوتامات موجود در پروترومبین، و فسفوسرین، فسفوترئونین و فسفوتیروزین، نمونه‌هایی از اسیدهای آمینه مشتق‌شده هستند.

اسیدهای آمینه معمول

ساختمان عمومی اسیدهای آمینه معمول در شکل ۲-۳ نشان داده شده است. این اسیدهای آمینه یک اتم کربن آلفا(α) دارند که به آن یک گروه اسید کربوکسیلیک، یک گروه آمینو و یک اتم هیدروژن اتصال کووالان دارند. علاوه بر این، به ظرفیت چهارم اتم کربن α یک گروه شیمیایی اختصاصی اتصال دارد که با R نشان داده شده و به آن زنجیر جانبی[3] گفته می‌شود که برای هر اسید آمینه معمول بی‌همتا است. شکل ۲-۳ حالت یونیزه اسیدهای آمینه را در محلولی با pH ۷ نشان می‌دهد. تحت شرایط فیزیولوژیک، گروه

1. Common amino acids 2 . Derived amino acids 3 . Side chain

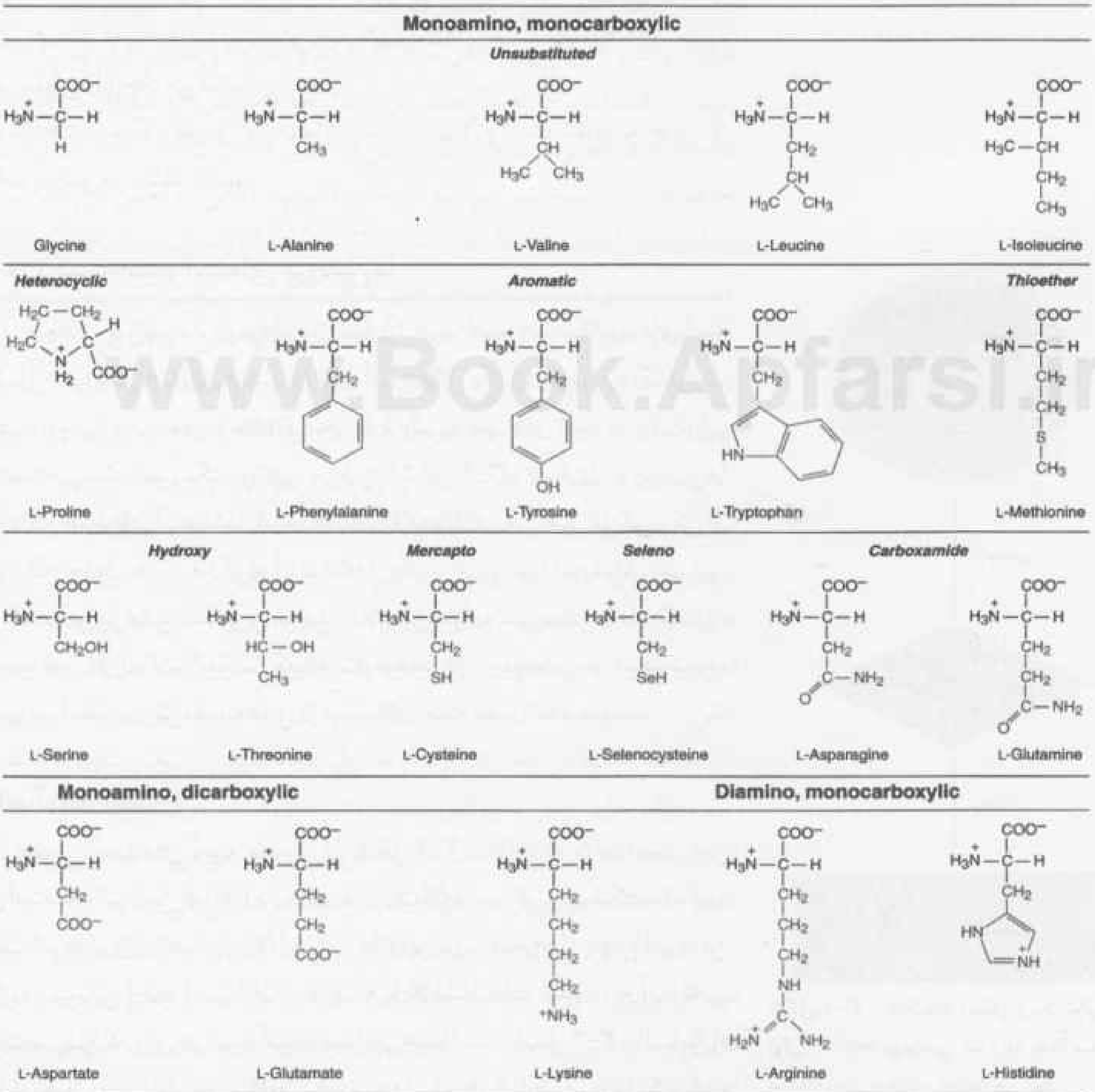


شکل ۲-۳ ساختمان عمومی اسیدهای آمینه معمول.

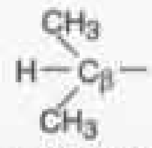
α– آمینو پروتونه و به شکل یون آمونیوم می‌باشد؛ گروه اسید کربوکسیلیک به‌حالت بدون پروتون یا شکل یون کربوکسیلات وجود دارد.

ماهیت شیمیایی و ساختمان α-آمینو اسیدها توسط زنجیرهای جانبی آنها تعیین می‌شود

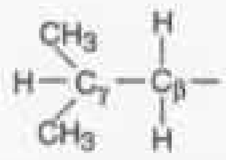
ساختمان اسیدهای آمینه معمول در شکل ۳-۳ نشان داده شده است. اسیدهای آمینه‌ای که زنجیر جانبی گروه آلکیل دارند، شامل گلیسین، آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین می‌باشند. **گلیسین** ساده‌ترین ساختمان را دارد که در آن R = H می‌باشد. **آلانین** یک گروه



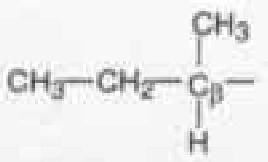
شکل ۳-۳ **ساختمان اسیدهای آمینه معمول.** اشکال باردار در pH برابر ۷٫۰ نشان داده شده‌اند.



Isopropyl R group of valine



Isobutyl R group of leucine



Isobutyl R group of isoleucine

شکل ۴-۳ زنجیرهای جانبی آلکیلی والین، لوسین و ایزولوسین.

متیل (CH_3—) دارد. **والین** یک گروه R ایزوپروپیل دارد (شکل ۴-۳). گروه‌های R مربوط به لوسین و ایزولوسین شامل گروه‌های ایزوبوتیل هستند که ایزومرهای ساختمانی یکدیگر می‌باشند. شاخه زنجیر جانبی ایزوبوتیل در **لوسین** بر روی کربن گاما(γ) و در **ایزولوسین** بر روی کربن بتا(β) قرار دارد (شکل ۴-۳).

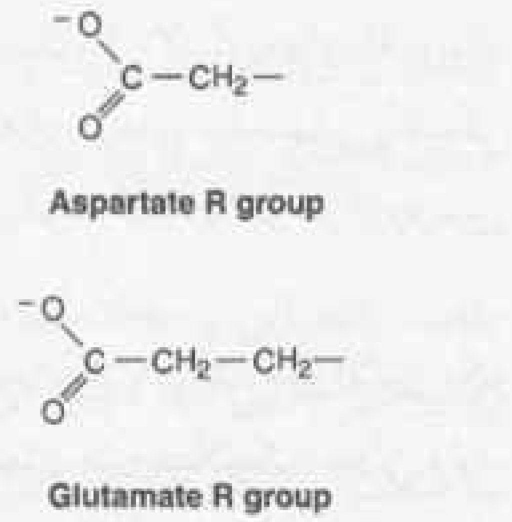
فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان، اسیدهای آمینه آروماتیک هستند. **فنیل آلانین** یک حلقه بنزن، **تیروزین** یک گروه فنلی و **تریپتوفان** یک ساختمان هتروسیکلیک اندولی دارد. در هر صورت بخش آروماتیک از طریق یک کربن متیلن ($—CH_2—$) به کربن α متصل است (شکل ۳-۳).

اسیدهای آمینه حاوی سولفور شامل سیستئین و متیونین می‌باشند. گروه زنجیر جانبی سیستئین یک تیومتیل ($HSCH_2—$) است و در **متیونین** زنجیر جانبی یک متیل اتیل تیول اتر ($CH_3SCH_2CH_2—$) می‌باشد.

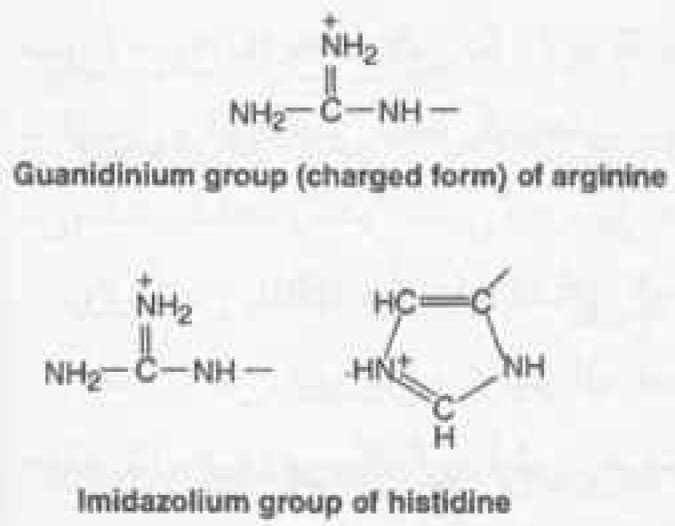
دو اسید آمینه حاوی گروه هیدروکسی (الکلی) شامل سرین و ترئونین می‌باشند. در سرین زنجیر جانبی یک هیدروکسی‌متیل ($HOCH_2—$) است. در **ترئونین** یک ساختمان اتانلی به کربن α اتصال یافته و تولید یک الکل دوم ($CH_3—CHOH—CH_\alpha—$) می‌کند.

پرولین از این نظر که گروه α–آمینو آن به زنجیر جانبی متصل شده است، بهتر است در گروه α–ایمینو اسیدها قرار داده شود، زیرا α–آمین آن یک آمین نوع دوم همراه با یک نیتروژن α با دو پیوند کووالان به کربن است. قرارگیری نیتروژن α–آمینو در یک حلقه پنج اتمی سبب محدودیت آزادی چرخش حول پیوند $—N_\alpha—C_\alpha—$ در پرولین و به موجب آن محدودیت همکاری پرولین در ایجاد کونفورماسیون‌های پلی‌پپتیدی خاص می‌شود.

اسیدهای آمینه‌ای که تاکنون مورد اشاره قرار گرفته‌اند، زنجیرهای جانبی دارند که در pH فیزیولوژیک بدون بار می‌باشند. **اسیدهای دی‌کربوکسیلیک-منوآمینو** یک گروه کربوکسیل در زنجیر جانبی خود دارند. در **آسپارتات** این گروه توسط یک کربن متیلن ($—CH_2—$) از کربن α جدا می‌شود (شکل ۵-۳). در **گلوتامات** (شکل ۵-۳)، این گروه توسط دو اتم کربن ($—CH_2—CH_2—$) از کربن α جدا شده است (شکل ۵-۳). در pH فیزیولوژیک، این گروه‌ها فاقد پروتون و دارای بار منفی هستند. **اسیدهای دی‌بازی-منوکربوکسیلیک** شامل لیزین، آرژینین و هیستیدین می‌باشند (شکل ۳-۳). در اینها گروه R حاوی یک یا دو اتم نیتروژن است که با اتصال به یک پروتون، همانند باز عمل می‌کند. در **لیزین** زنجیر جانبی یک N–بوتیل آمین است. در **آرژینین** این زنجیر جانبی حاوی یک گروه گوانیدینو (شکل ۶-۳) است که سه اتم کربن متیلن از کربن α فاصله دارد. هر دو گروه ε–آمینو لیزین و گوانیدینوی آرژینین در pH فیزیولوژیک (pH حدود ۷) پروتونه هستند و بار مثبت دارند. در **هیستیدین** زنجیر جانبی یک ساختمان هتروسیلیک پنج-اتمی، گروه ایمیدازول، است (شکل ۶-۳). pK'_a گروه ایمیدازول در آب حدود ۶٫۰ می‌باشد؛ لذا در محلول‌های



شکل ۵-۳   زنجیرهای جانبی آسپارتات و گلوتامات.



شکل ۶-۳   گروه‌های گوانیدینیوم و ایمیدازولیوم آرژینین و هیستیدین.

فیزیولوژیک غلظت نسبتاً بالای اشکال بازی (ایمیدازول) و اسیدی (ایمیدازولیوم) زنجیر جانبی هیستیدین وجود دارد.

گلوتامین و **آسپاراژین** آنالوگ‌های ساختمانی اسید گلوتامیک و اسید آسپارتیک هستند که در آنها گروه‌های اسید کربوکسیلیک زنجیر جانبی، آمیده می‌باشند. در DNA کدون‌های بی‌همتایی بـرای گلوتامین و آسپاراژین وجود دارد که متفاوت از انـواع مربوط به اسید گلوتامیک و اسید آسپارتیک می‌باشند. زنجیرهای جانبی گلوتامین و آسپاراژین نمی‌توانند پروتونه شوند و در pH فیزیولوژیک بدون بار می‌باشند.

تا اواسط دهه ۱۹۶۰ معتقد بودند که تمامی کدون‌های سه-نوکلئوتیدی DNAای اسیدهای آمینه معمول موجود در پروتئین‌ها تعیین شده است. تعداد کل اسیدهای آمینه معمول ۲۰ بود که از ۶۴ کدون سه‌حرفی همراه با ۳ کدون مربوط به خاتمه ترجمه قالب‌های خواندن باز مشتق می‌شدند (جدول ۱-۶ را ببینید). هرچند، در سال ۱۹۸۸ بیست و یکمین اسید آمینه معمول، یعنی **سلنوسیستئین** (شکل ۳-۳)، با یک کدون اختصاصی در mRNA و tRNAای که سلنوسیستئین را در هنگام ترجمه mRNA در داخل زنجیرهای پلی‌پپتیدی قرار می‌دهد، شناسایی شد. سلنوسیستئین از نظر ساختمانی مشابه سیستئین است، ولی به‌جای اتم سولفور، یک اتم سلنیوم دارد. مشکل مربوط به کدون سلنوسیستئین این است که این کدون یکی از کدون‌های خاتمه‌ای است که به پیام خاتمه ترجمه می‌شود. لذا این کدون، یعنی UGA، دو معنی دارد. در اکثر موارد این کدون پیام خاتمه را کد می‌کند، ولی در زمینه RNA اختصاصی، قرارگیری سلنوسیستئین در داخل توالی پلی‌پپتیدی را کد خواهد نمود. این موارد نادر هستند و تنها ۲۵ ژن در ژنوم انسانی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که سلنوسیستئین را در داخل زنجیر قرار می‌دهند. به علاوه، در حالی که پروتئین‌های سلنوسیستئینی در تمامی حیوانات یافت می‌شوند، این کدون همگانی نیست و در گیاهان عالی، مخمر یا اکثر باکتری‌ها وجود ندارد. در مطالعات حیوانی نشان داده شده است که ناتوان‌سازی[1] ژن مربوط به tRNA سلنوسیستئین کشنده است که به

جدول ۱-۳ • مخفف‌های مربوط به اسیدهای آمینه

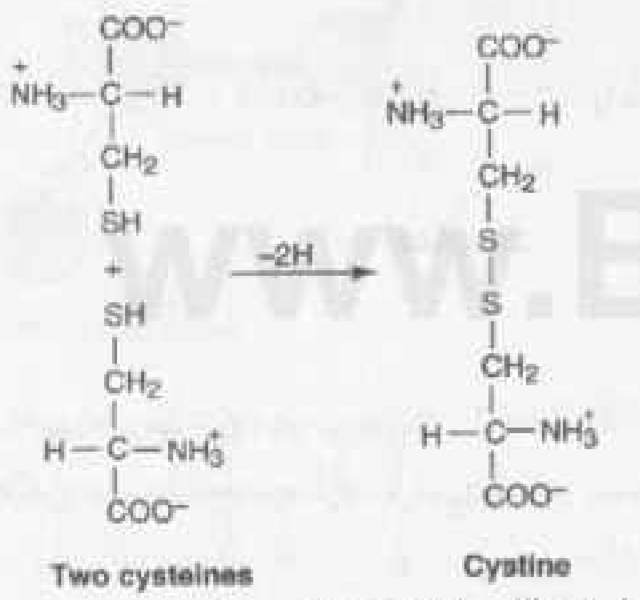
اسید آمینه	مخفف سه حرفی	مخفف تک حرفی
Alanice	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Aspartare	Asp	D
Asparagine or aspartate	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glycine	Gly	G
Gluramine	Gln	Q
Gluramate	Gln	E
Glutamine or glutamate	Glx	Z
Histidine	His	H
Isoleucine	IIe	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	pro	P
Selenocysteine	Sec	U
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

1. Knockout

معنی ضروری‌بودن سلنوسیستئین برای تداوم حیات در گونه‌های حیوانی است. بسیاری از سلنوپروتئین‌ها نقش آنتی‌اکسیدانی در حذف گونه‌های واکنشگر اکسیژن دارند.

برای نمایش توالی اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها، از مخفف‌های سه-حرفی یا تک-حرفی اسیدهای آمینه استفاده می‌شود (جدول ۱-۴). این مخفف‌ها عموماً مورد قبول بوده و در سرتاسر این کتاب مورد استفاده قرار می‌گیرند (جدول ۱-۳). دقت داشته باشید تا مخفف‌های سه-حرفی مربوط به اسید آسپارتیک (Asp) و اسید گلوتامیک (Glu) با انواع مربوط به آسپاراژین (Asn) و گلوتامین (Gln) اشتباه نشوند. در هنگام تعیین ترکیب اسید آمینه‌ای یک پروتئین با روش‌های شیمیایی، براحتی نمی‌توان بین Asn و Asp یا بین Gln و Glu تمایز قائل شد، زیرا گروه‌های آمیدی زنجیر جانبی موجود در Asn و Gln هیدرولیز شده و تولید Asp و Glu می‌شود (قسمت ۹-۳). لذا در این روش‌های مبهم از سمبل‌های Asx برای Asp یا Asn و Glx برای Glu یا Gln استفاده می‌شود. از طرح مشابهی برای مخفف‌های یک-حرفی Asp یا Asn و Glu یا Gln استفاده می‌شود.

سیستین یک مشتق اسید آمینه‌ای است که در نتیجه اکسیداسیون دو ریشه سیستئین حاصل می‌شود

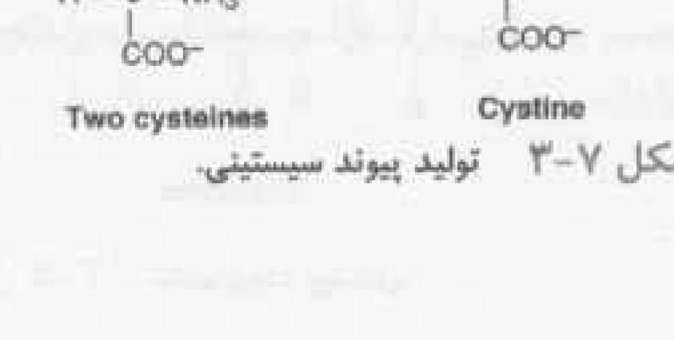


شکل ۷-۳ تولید پیوند سیستینی.

سیستین یکی از مشتقات اسید آمینه‌ای است که در بسیاری از پروتئین‌ها یافت می‌شود. سیستین از اکسیداسیون دو زنجیر جانبی تیولی سیستئین و ایجاد یک پیوند دی‌سولفیدی کووالان تولید می‌شود (شکل ۷-۳). در داخل پروتئین‌ها، اتصالات دی‌سولفیدی ریشه‌های سیستئینی را به یکدیگر متصل می‌کنند که در داخل یک زنجیر پلی‌پپتیدی جدا از یکدیگر وجود دارند (درون‌زنجیری) و یا در داخل دو زنجیر پلی‌پپتیدی قرار دارند (بین‌زنجیری)؛ این اتصالات نقش مهمی در تثبیت کونفورماسیون تاشده پروتئین‌ها دارند (ساختمان انسولین در شکل ۲۳-۳ را ببینید).

α-آمینو اسیدها یک کربن نامتقارن دارند

اسیدهای آمینه معمول (شکل ۲-۳ را ببینید) چهار استخلاف (R، H، COO^- و NH_3^+) دارند که با اتصال کووالان به اتم کربن α متصل می‌باشند. یک اتم کربن با چهار استخلاف متفاوت با یک کونفیگوراسیون چهاروجهی، نامتقارن است و دو شکل انانتیومری دارد. ازاینرو، تمامی اسیدهای آمینه ایزومر نوری دارند؛ به غیر از گلیسین که در آن $R = H$ است و بنابراین دو مورد از چهار استخلاف موجود بر روی اتم α هیدروژن می‌باشند. با استفاده از طرح امتدادی فیشر[1]، کونفیگوراسیون مطلق یک اسید آمینه در شکل ۸-۳ نشان داده شده است که در آن موقعیت فضایی آرایش چهاروجهی استخلاف‌های کربن α مشخص می‌باشد. گروه α—COO^- در بالا و پشت صفحه قرار دارد و گروه R در پایین و پشت

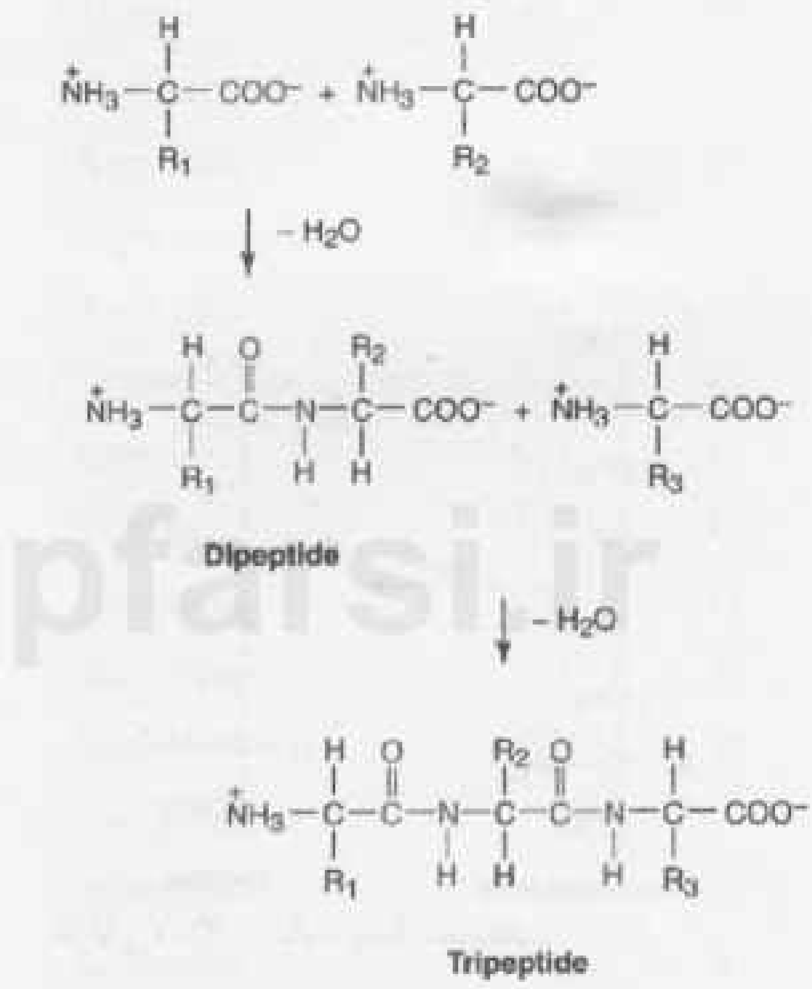


شکل ۸-۳ کونفیگوراسیون مطلق یک اسید آمینه.

1. Fischer projection

صفحه می‌باشد. گروه‌های α—H و α—NH_3^+ به‌سمت خواننده می‌باشند. گروه α—NH_3^+ اسید آمینه‌ای که به این شکل امتداد یافته‌اند، ممکن است در سمت چپ یا راست اتم کربن α قرار داشته باشد. طبق قرارداد، در صورتی که α—NH_3^+ به‌سمت چپ باشد، یک کونفیگوراسیون مطلق L وجود دارد. انانتیومر این ترکیب که در آن α—NH_3^+ به‌سمت راست می‌باشد، کونفیگوراسیون مطلق D را دارد. پروتئین‌های پستانداران حاوی اسیدهای آمینه‌ای با تنها کونفیگوراسیون L هستند. علائم L و D اشاره به توانایی در چرخش نور پولاریزه به چپ[1] (L) یا راست[2] (D) نسبت به صفحه پولاریزاسیون دارد.

از آنجایی‌که اسیدهای آمینه موجود در پروتئین‌ها نامتقارن هستند، پروتئین‌ها نیز خصوصیات عدم تقارن را نشان می‌دهند.

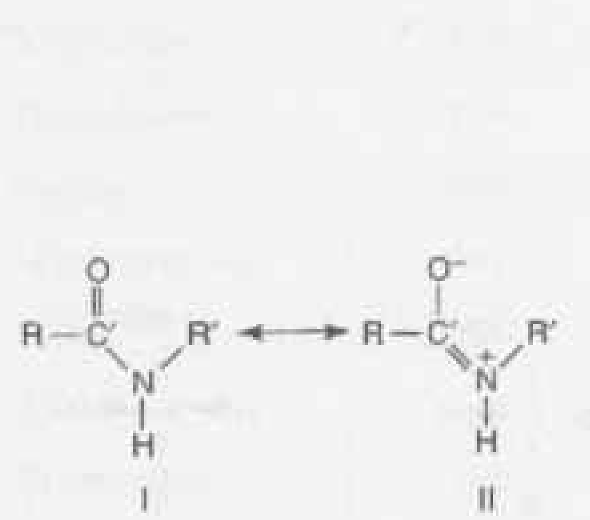


شکل ۹-۳ تولید پیوند پپتیدی.

اسیدهای آمینه از طریق پیوندهای پپتیدی به یکدیگر اتصال می‌یابند

اتصال مجموعه‌ای از اسیدهای آمینه معمول در زنجیرهای پلی‌پپتیدی موجود در سلول‌ها، به طریق آنزیمی کاتالیز می‌شود (ص ۳۰۲). از نظر شیمیایی، این یک واکنش دهیدراتاسیون است (شکل ۹-۳). با حذف یک ملکول آب، گروه α-کربوکسیل یک اسید آمینه یک **پیوند پپتیدی** کووالان با گروه α-آمینوی اسید آمینه دیگر ایجاد می‌کند. سپس **دی‌پپتید** (اتصال دو اسید آمینه توسط یک پیوند پپتیدی) حاصل می‌تواند از طریق گروه اسید کربوکسیلیک خود با گروه α-آمینوی اسید آمینه سوم، پیوند پپتیدی دوم را ایجاد کند که نتیجه آن تولید یک تری‌پپتید می‌باشد (شکل ۹-۳). با تکرار این فرایند تولید **پلی‌پپتیدی** یا پروتئینی با یک توالی اسید آمینه‌ای اختصاصی می‌شود. این ساختمان اولیه پروتئین است که از قبل توسط توالی نوکلئوتیدی ژن مربوطه تعیین می‌شود. این **ساختمان اولیه** بی‌همتا یک زنجیر پلی‌پپتیدی را قادر می‌سازد تا به یک ساختمان سه-بُعدی تا شود که به پروتئین خصوصیات شیمیایی و فیزیولوژیکی آن را می‌دهد.

یک پیوند می‌تواند به صورت دو **ایزومر رزونانس** نمایش داده شود (شکل ۱۰-۳). در ساختمان I، یک پیوند دوگانه در بین کربن کربونیل و اکسیژن کربونیل ($C'-O$) وجود دارد و اتصال کربن کربونیل به نیتروژن یک پیوند یگانه ($C'-N$) است. در ساختمان II اتصال کربن به اکسیژن از نوع پیوند یگانه ($C'-O^-$) و اتصال کربن کربونیل به نیتروژن از نوع پیوند دوگانه ($C'=N$) است. در ساختمان II یک بار منفی بر روی اکسیژن و یک بار مثبت بر روی نیتروژن وجود دارد. پیوندهای پپتیدی واقعی یک رزونانس هیبرید از این دو ساختمان ایزومر الکترونی را دارند که در آن پیوند بین کربن و نیتروژن، ۵۰٪ ویژگی یک پیوند دوگانه را دارد. مطالعات انکسار اشعه-X این حالت را مورد تأیید قرار می‌دهد و طول پیوند کربن کربونیل تا نیتروژن (۱٫۳۳Å) تقریباً بین طول یک پیوند یگانه C'—N (حدود ۱٫۴۵Å

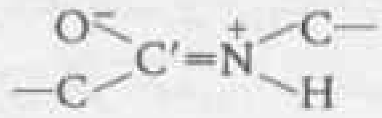


شکل ۱۰-۳ ساختمان‌های مربوط به ایزومر الکتروستاتیک یک پیوند پپتیدی.

1. Levo 2. Dextro

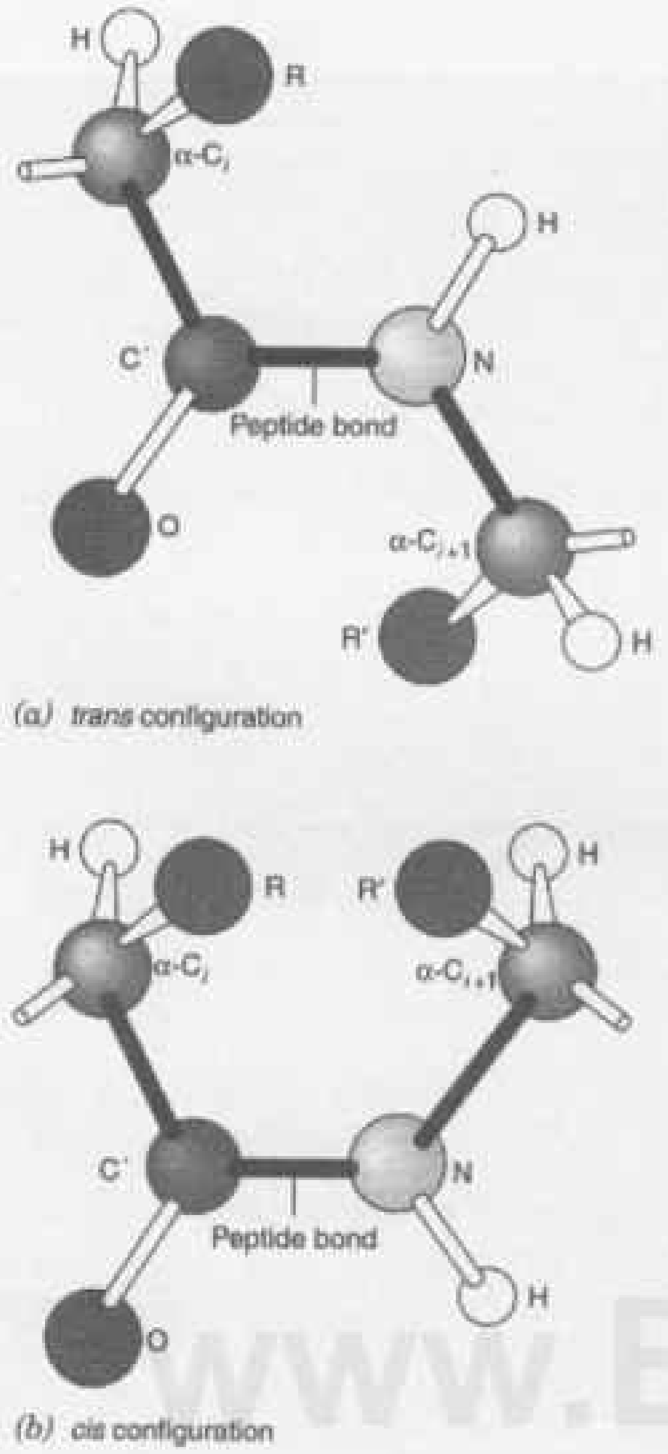
و یک پیوند دوگانه $C'=N$ (حدود ۱٫۲۵Å) می‌باشد.

نتیجه این خصوصیت پیوند دوگانه نسبی این است که حول پیوند کربن کربونیل به نیتروژن یک پیوند پپتیدی، چرخش آزادی در درجه حرارت فیزیولوژیک وجود ندارد. نتیجه دوم خصوصیت پیوند دوگانه این است که تمامی اتم‌های متصل به C' و N در یک صفحه مشترک قرار دارند.

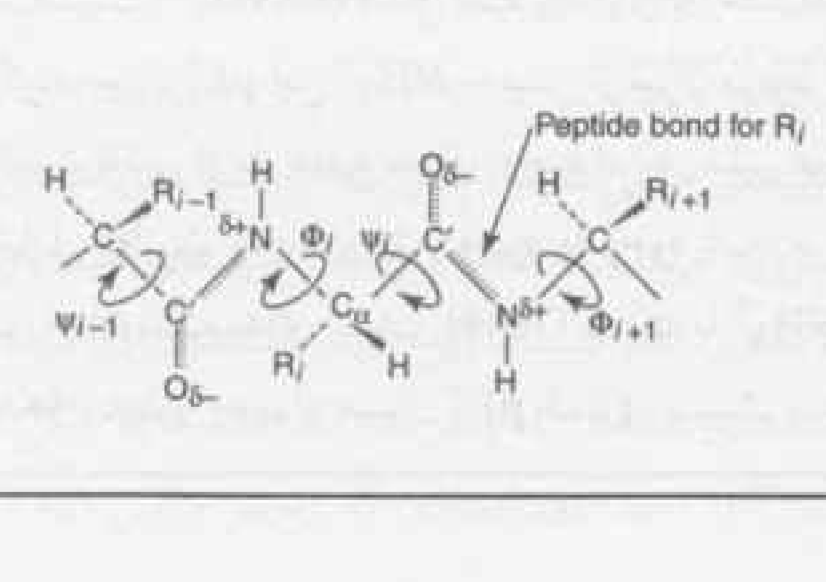


لذا یک زنجیر پلی‌پپتیدی متشکل از صفحاتی از پیوندهای پپتیدی است که در محل اتم‌های کربن α به یکدیگر اتصال دارند. این کربن α پیوندهای پپتیدی را از طریق پیوندهای یگانه‌ای به یکدیگر متصل می‌کند که به صفحات پپتیدی مجاور این امکان را می‌دهد تا نسبت به یکدیگر چرخش کنند. هر **ریشه اسید آمینه** یک کربن α، دو پیوند یگانه و یک پیوند پپتیدی را در اختیار زنجیر پلی‌پپتیدی قرار می‌دهد (شکل ۱۱-۳). واژه ریشه[1] اشاره به اتم‌هایی دارد که یک اسید آمینه در اختیار یک زنجیر پلی‌پپتیدی قرار می‌دهد که شامل اتم‌های زنجیر جانبی می‌باشد.

پیوند پپتیدی که در شکل $12a$-۳ ملاحظه می‌گردد، **کونفیگوراسیون ترانس** اتم‌های اکسیژن (O) و هیدروژن (H) را نشان می‌دهد. این پایدارترین کونفیگوراسیون می‌باشد که در آن دو زنجیر جانبی ریشه‌های مجاور (R و R') نیز در حالت ترانس می‌باشند. با **کونفیگوراسیون سیس** (شکل $12b$-۳) دو گروه زنجیر جانبی در یک سمت پیوند $C'=N$ قرار می‌گیرند که به‌دلیل ممانعت فضایی بین گروه‌های R نامساعد می‌باشد. بر این اساس، در داخل پروتئین‌ها پیوندهای پپتیدی ترانس وجود دارند، به استثناء مواردی که مربوط به ریشه‌های پرولین می‌باشند. گروه α–آمینو در زنجیر جانبی پرولین قرار دارد و هر دو کونفیگوراسیون سیس و ترانس پیوند پپتیدی مربوط به گروه α–ایمینوی پرولین، تعاملات نامساعد با کربن α اسید آمینه مجاوری دارد که با این α–ایمینو پیوند پپتیدی ایجاد کرده است. لذا تعداد زیادی از پیوندهای پپتیدی مربوط به پرولین در یک زنجیر پلی‌پپتیدی بی‌ساختمان[2] یا دناتوره[3]، کونفیگوراسیون هم ترانس و هم سیس خواهند داشت. کونفیگو-



شکل ۱۲-۳ (a) پیوند پپتیدی ترانس. (b) پیوند پپتیدی سیس. پیوندهای $C'-N$ یک خصوصیت پیوند دوگانه نسبی را دارند.



شکل ۱۱-۳ ریشه اسید آمینه موجود در داخل یک زنجیر پلی‌پپتیدی. هر ریشه یک پلی‌پپتید، دو پیوند یگانه و یک پیوند پپتیدی در این زنجیر دارد. پیوندهای یگانه آنهایی هستند که بین اتم‌های C_α و کربونیل C' و اتم‌های C_α و N به‌وجود می‌آیند. (برای تعریف زوایای ϕ و ψ به صفحه ۱۲۴ مراجعه کنید.)

1. Residue   2. Unstructured   3. Denaturated

راسیون پیوند پپتیدی پرولینی در یک پروتئین تاشده بستگی به نیروهایی دارد که توسط ساختمان سه-بُعدی ملکول پروتئینی خاصی که پرولین در داخل آن مدفون شده است، بر روی آن پیوند پرولینی وارد می‌شود.

یکی از بزرگترین پلی‌پپتیدها در انسان، پروتئین عضلانی تیتین می‌باشد که حدود ۲۷,۰۰۰ اسید آمینه در یک زنجیر پلی‌پپتیدی دارد. با این وجود، طول زنجیر به تنهایی عملکرد یک پروتئین را تعیین نمی‌کند. بسیاری از پپتیدهای کوچک با کمتر از ۱۰ اسید آمینه، فعالیت‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مهمی را در انسان بر عهده دارند (جدول ۲-۳). ساختمان‌های اول براساس قراردادهای استاندارد نوشته می‌شوند و به‌طور متوالی از انتهای آمینو به انتهای کربوکسیل شماره‌گذاری می‌شوند که مطابق با ترتیب افزودن اسید آمینه به زنجیر در هنگام بیوسنتز می‌باشد. بر همین اساس، در مورد هورمون آزادکننده تیروتروپین (جدول ۲-۳)، ریشه اسید گلوتامیک در سمت چپ، اسید آمینه انتهای آمینوی این زنجیر تری‌پپتیدی است و ریشه اسید آمینه شماره ۱ در توالی مربوطه می‌باشد. پرولین اسید آمینه انتهای کربوکسیل و ریشه شماره ۳ می‌باشد. جهت تعریف‌شده این زنجیر پلی‌پپتیدی[1] از Glu تا Pro (اسید آمینه انتهای آمینو تا اسید آمینه انتهای کربوکسیل) می‌باشد.

۳-۳ • بار و خصوصیات شیمیایی اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها

گروه‌های قابل‌یونیزاسیون اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها برای فعالیت بیولوژیکی مهم هستند

گروه‌های قابل یونیزاسیون معمول موجود در پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه در جدول ۳-۳ نشان داده شده‌اند. اشکال اسیدی در سمت چپ علامت تعادل و اشکال بازی در سمت راست آن قرار دارند. شکل اسیدی با ازدست‌دادن یک پروتون به باز مزدوج خود تبدیل می‌شود. برعکس، باز تولیدی با دریافت پروتون تولید اسید مربوطه می‌کند. تفکیک یک اسید توسط یک ثابت تفکیک اسیدی (K'_a) و میزان (pK'_a) آن مشخص می‌شود: ($pK'_a = \log(1/K'_a)$. جدول ۳-۳ دامنه‌ای از مقادیر pK'_a را برای هر گروه اسیدی نشان می‌دهد، زیرا pK'_a بستگی به محیطی دارد که در آن گروه اسیدی قرار دارد. برای مثال، وقتی گروه آمونیوم با بار مثبت در نزدیکی یک گروه با بار منفی در یک پروتئین قرار می‌گیرد، این بار منفی سبب تثبیت ($-NH_3^+$) شکل اسیدی دارای بار مثبت شده و تفکیک پروتون آن مشکل‌تر می‌گردد. میزان pK'_a این $-NH_3^+$ بیش از میزان مربوط به یک گروه آمونیومی است که در آن تثبیت ناشی از بار منفی مجاور وجود ندارد. سایر عواملی که بر روی pK'_a اثر می‌گذارند شامل قطبیت محیط، عدم وجود یا وجود آب، و پتانسیل تولید پیوند هیدروژنی است. به‌علاوه، گروه‌های اسیدی ($\alpha-COOH$ یا $\alpha-NH_3^+$) موجود در دو انتهای پلی‌پپتیدها به‌طور معمول میزان pK'_a کمتری نسبت به‌همان نوع گروه‌های

۱. به دلیل داشتن تنها سه ریشه اسید آمینه، واژه «پپتید» صحیح‌تر است. مترجم

جدول ۲-۳ • پپتیدهای دارای فعالیت بیولوژیک

توالی اسید آمینه‌ای	نام	فعالیت
1 3 pyroGlu-His-Pro(NH$_2$)[a]	هورمون آزادکننده تیروتروپین	ترشح توسط هیپوتالاموس؛ سبب آزادسازی هورمون تیروتروپیک از غده هیپوفیز قدامی می‌شود
1 9 H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly(NH$_2$)[b,c] S———S	وازوپرسین (هورمون ضدادراری)	ترشح توسط غده هیپوفیز خلفی؛ مانع دفع کلیوی آب به‌داخل ادرار می‌شود
1 5 H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	میتونین انکفالین	پپتید اوپیات-مانند موجود در مغز که مانع حس درد می‌شود
1 10 pyroGlu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu- 11 17 Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe(NH$_2$)[d,c] | SO_3	گاسترین کوچک (انسان)	هورمون ترشحی توسط سلول‌های مخاطی در معده؛ سبب ترشح اسید از سلول‌های پاریتال معده می‌شود
1 10 H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr- 11 20 Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln- 21 29 Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH	گلوکاگون (گاوی)	هورمون پانکراتیک درگیر در تنظیم متابولیسم گلوکز
1 8 H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH	آنژیوتانسین II (اسب)	پپتیدافزایش‌دهنده فشار خون؛ آزادسازی آلدوسترون از کورتکس آدرنال را نیز تحریک می‌کند
1 9 H-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH	برادی کینین پلاسمایی (گاو)	پپتید متسع‌کننده عروقی
1 10 H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met(NH$_2$)	ماده P	نوروترانسمیتر

[a] Glu انتهای آمینو به شکل «پیرو» می‌باشد که در آن $\gamma-COOH$ از طریق یک پیوند آمیدی اتصال کووالان به $\alpha-NH_2$ دارد؛ اسید آمینه انتهای کربوکسیل نیز آمیده و عرزاد است.

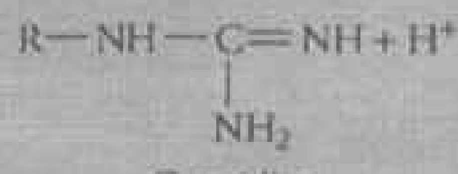
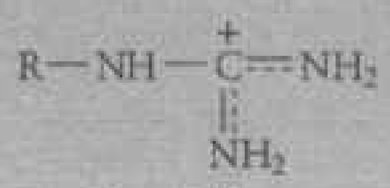
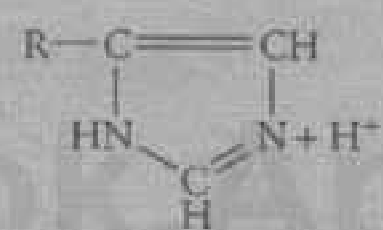
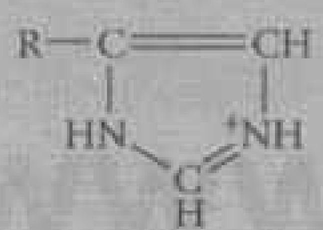
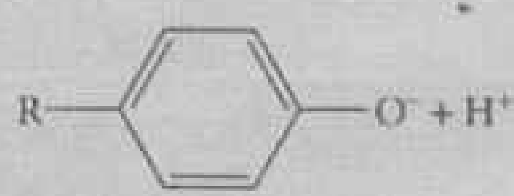
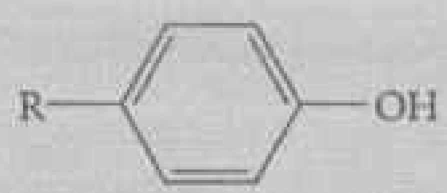
[b] سیستئین-۱ و سیستئین-۶ از طریق ایجاد یک ساختمان پیوند دی‌سولفیدی در داخل این نوناپپتید به یکدیگر اتصال دارند.

[d] تیروزین ۱۲ بر روی گروه هیدروکسیل زنجیر جانبی خود سولفونه می‌باشد.

[c] اسید آمینه انتهای کربوکسیل، آمیده است.

اسیدی موجود در زنجیرهای جانبی دارند (جدول ۴-۳). اسیدهای آمینه‌ای که گروه‌های R آنها حاوی اتم‌های نیتروژن می‌باشند (Lys و Arg)، **اسیدهای آمینه بازی** هستند، زیرا زنجیرهای جانبی آنها مقادیر pK'_a نسبتاً بالایی دارند و به‌عنوان باز در pH فیزیولوژیک عمل می‌کنند. این اسیدهای آمینه در pH فیزیولوژیک معمولاً به شکل اسیدی و با بار مثبت هستند. مقادیر pK'_a اسیدهای آمینه‌ای که زنجیر جانبی آنها یک گروه اسید

جدول ۳-۳ • مقادیر pK'_a گروه‌های اسیدی معمول موجود در پروتئین‌ها

جایی که گروه اسیدی یافت می‌شود	شکل بازی		شکل اسیدی	دامنه تقریبی pK'_a گروه
انتهای آمینو یا زنجیر جانبی لیزین	$R{-}NH_2 + H^+$ Amine	⇌	$R{-}NH_3^+$ Ammonium	۷٫۵ –۱۰٫۶
انتهای کربوکسیل یا زنجیرهای جانبی گلوتامات و آسپارتات	$R{-}COO^- + H^+$ Carboxylate	⇌	$R{-}COOH$ Carboxylic acid	۳٫۰–۵٫۵
زنجیر جانبی آرژنین	 Guanidino	⇌	 Guanidinium	۱۱٫۵ –۱۲٫۵
زنجیر جانبی سیستئین	$R{-}S^- + H^+$ Thiolate	⇌	$R{-}SH$ Thiol	۸٫۰–۹٫۰
زنجیر جانبی هیستیدین	 Imidazole	⇌	 Imidazolium	۶٫۰–۷٫۰
زنجیر جانبی تیروزین	 Phenolate	⇌	 Phenol	۹٫۵–۱۰٫۵

کربوکسیلیک دارند، نسبتاً پایین می‌باشد که براحتی پروتون خود را از دست می‌دهند و **اسیدهای آمینه اسیدی** هستند. اینها در pH فیزیولوژیک عمدتاً به اشکال غیرپروتونه و با بار منفی وجود دارند. پروتئین‌هایی که در آنها نسبت $(\Sigma Lys + \Sigma Arg)/(\Sigma Glu + \Sigma Asp)$ بیش از ۱ است، **پروتئین‌های بازی** هستند. در **پروتئین‌های اسیدی** این نسبت کمتر از ۱ می‌باشد.

اشکال یونی یک اسید آمینه یا پروتئین را می‌توان در یک pH خاص تعیین نمود

با استفاده از مقادیر pK'_a هر کدام از گروه‌های اسیدی موجود در یک اسید آمینه یا پروتئین و معادله هندرسن–هاسلباخ (شکل ۳-۱۳)، شکل یونی ملکول را می‌توان در یک pH

جدول ۴-۳ • pK'_a گروه‌های اسیدی زنجیر جانبی و انتهایی در ریبونوکلئاز

	$—NH_3^+$	$—COOH$
زنجیر جانبی	Lysines = ۱۰٫۲	Glu and Asp = ۴٫۶
انتهای زنجیر	N-terminal = ۷٫۸	C-terminal = ۳٫۸

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{conjugate base}]}{[\text{conjugate acid}]}$$

or

$$pH - pK_a = \log \frac{[\text{conjugate base}]}{[\text{conjugate acid}]}$$

شکل ۱۳-۳ معادله هندرسن-هاسلباخ. (برای جزئیات مربوط به این بحث به صفحه ۱۲ مراجعه کنید.)

خاص تعیین نمود. این معادله مهمی است، زیرا تغییر در وضعیت یونیزاسیون و بار یک مولکول را با pH نشان می‌دهد. فعالیت‌های فیزیولوژیک یک مولکول برحسب pH و وضعیت یونیزاسیون تغییر می‌کند. برای مثال، برخی آنزیم‌ها نیاز به یک ایمیدازول هیستیدینی در شکل بازی خود برای فعالیت کاتالیتیکی دارند. در صورتی‌که pK'_a این هیستیدین ۶٫۰ باشد، در pH۶٫۰ نیمی از مولکول‌های آنزیم به شکل **بازی (ایمیدازولی)** فعال و نیمی از مولکول‌های آنزیم به شکل غیرفعال **اسیدی (ایمیدازولیوم)** وجود دارند. لذا این آنزیم ۵۰٪ فعالیت بالقوه خود را نشان می‌دهد. در pH۷٫۰، نسبت ایمیدازول به ایمیدازولیوم برابر ۱۰ به ۱ می‌باشد (جدول ۵-۳) و این آنزیم ۹۱٪ = ۱۰۰ × (۱+۱۰)/۱۰ فعالیت بالقوه خود را نشان می‌دهد. لذا یک تغییر اساسی در pH اثر برجسته‌ای بر فعالیت آنزیمی دارد.

جدول ۵-۳ • ارتباط بین تفاوت pH و pK'_a و نسبت غلظت‌های باز به اسید مزدوج

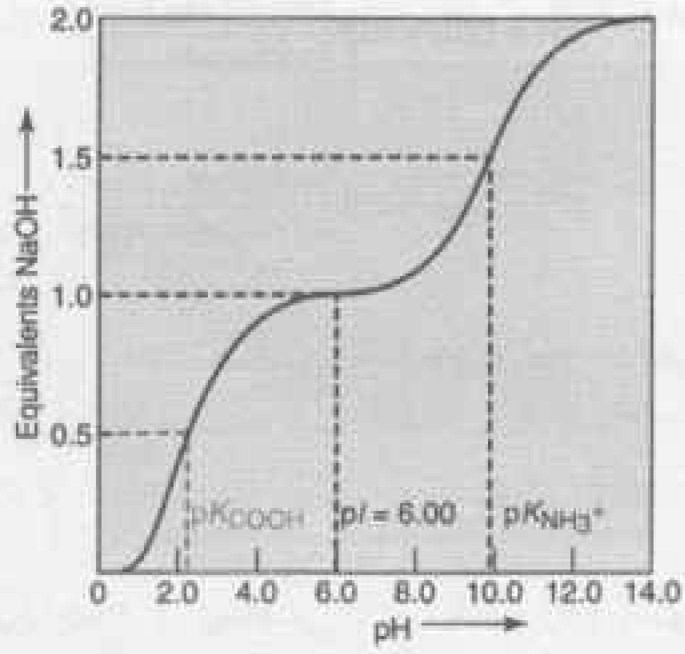
$pH - pK'_a$ (تفاوت بین pH و pK'_a)	نسبت غلظت باز به اسید مزدوج
۰	۱
۱	۱۰
۲	۱۰۰
۳	۱۰۰۰
-۱	۰٫۱
-۲	۰٫۰۱
-۳	۰٫۰۰۱

تیتراسیون یک اسید منوآمینو و منوکربوکسیلیک: تعیین pH ایزوالکتریک

به‌دنبال تیتراسیون گروه‌های قابل یونیزاسیون یک اسید آمینه ساده، شناخت اشکال اسیدی و بازی یک پروتئین و ارتباط آنها با بار واضح‌تر می‌شود. در شکل ۱۴-۳، لوسین یک $\alpha—COOH$ با pK'_a = ۲٫۴ و یک گروه $\alpha—NH_3^+$ با PK'_a = ۹٫۶ دارد. در pH ۱٫۰ شکل یونی غالب (شکل I) بار ۱+ دارد و در یک میدان الکتریکی به‌سمت کاتد می‌رود. افزودن ۰٫۵ اکی‌والان باز همراه با تیتراسیون نیمی از گروه‌های $\alpha—COOH$ می‌باشد؛ به عبارت دیگر نسبت $[COO^-]/[COOH]$ برابر ۱ است. معادله هندرسن-هاسلباخ، در حالتی که سمت راست این معادله در نسبت باز مزدوج به اسید ۱ به ۱ برابر ۰ = $\log(1)$ = log[(باز)/(اسید)] است، نشان می‌دهد که pH (در زمانی که نیمی از $\alpha-COOH$ تیتر شده است) مستقیماً برابر با $pK'_a(\alpha COOH)$ می‌باشد (شکل ۱۵-۳).

افزودن ۱ اکی‌والان باز در pH = ۶٫۰ به‌طور کامل $\alpha-COOH$ را تیتر می‌کند، ولی اثری بر روی گروه $\alpha-NH_3^+$ ندارد. در شکل حاصل (II)، بارهای منفی و مثبت یکدیگر را خنثی می‌کنند و بار خالص صفر است. شکل II شکل **زویتریون** است که خود شکل یونی است که در آن مجموع بارهای مثبت برابر مجموع بارهای منفی است. از آنجایی که بار خالص مولکول زویتریون صفر است، در میدان الکتریکی حرکتی ندارد. با افزودن ۰٫۵

شکل ۱۴-۳ اشکال یونی لوسین.



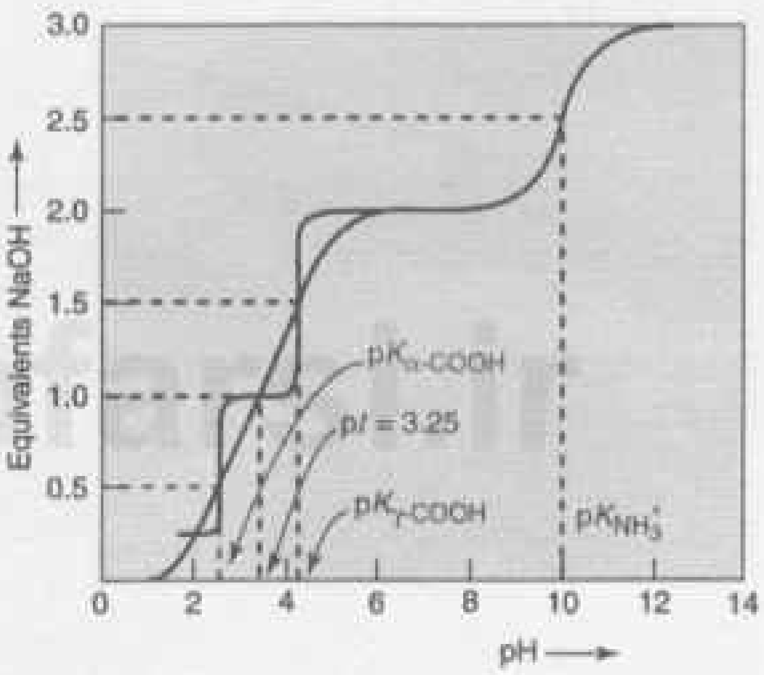
شکل ۱۵-۳ منحنی تیتراسیون لوسین.

اکی‌والان باز دیگر به شکل زویتریونی (افزودن مجموعاً ۱٫۵ اکی‌والان)، نیمی از گروه $\alpha-NH_3^+$ تیتر می‌شود. در این نقطه نسبت $[NH_2]/[NH_3^+]=1$ و pH برابر میزان pK_a' مربوط به گروه $\alpha-NH_3^+$ می‌باشد (شکل ۱۵-۳). با افزودن ۰٫۵ اکی‌والان دیگر باز (افزودن در مجموع دو اکی‌والان کامل باز)، به‌طور کامل گروه $\alpha-NH_3^+$، به شکل بازی آن $\alpha-NH_2$ تیتر می‌شود (شکل ۱۵-۳). pH به بیش از ۱۱ افزایش می‌یابد و گونه ملکولی غالب (شکل III) یک بار منفی دارد.

محاسبه میزانی از pH که در آن یک اسید آمینه به شکل زویتریونی خود وجود دارد، مفید می‌باشد. این pH میزان **pH ایزوالکتریک** ملکول است که با **pI** نشان داده می‌شود. میزان pI برای ترکیبی با یک قدرت یونی و درجه حرارت خاص، ثابت می‌باشد. برای ملکول‌های اسید آمینه ساده، نظیر لوسین، pI به‌صورت متوسط دو میزان pK_a' محاسبه می‌شود که محدوده‌های شکل زویتریونی را تعیین می‌کنند. برای نمونه

$$pI=\frac{pK_a'COOH+pK_a'NH_3^+}{۲}=\frac{۲٫۴+۹٫۶}{۲}=۶٫۰$$

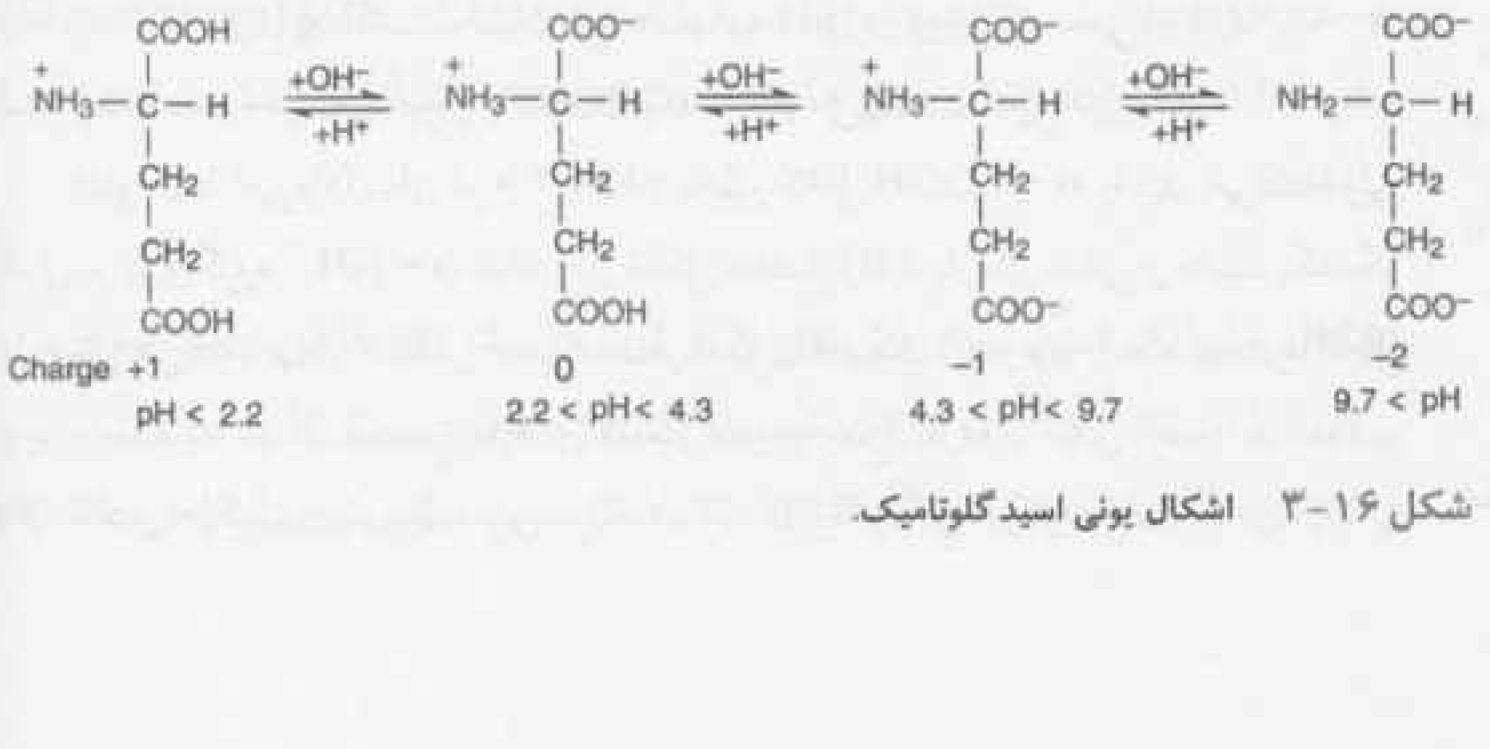
در pH بیش از ۶٫۰ لوسین یک بار منفی نسبی دارد که در pH بالا تا یک بار منفی کامل ۱- (شکل III) افزایش می‌یابد (شکل ۱۴-۳). در pH کمتر از ۶، لوسین بار نسبی مثبت دارد تا این که در pH بسیار اسیدی بار ۱+ (شکل I) را به‌دست می‌آورد. بار در هر میزان pH را می‌توان از معادل هندرسن-هاسلباخ محاسبه و یا از منحنی تیتراسیون شکل ۱۵-۳ به‌دست آورد.



شکل ۱۷-۳ منحنی تیتراسیون اسید گلوتامیک. خط مشاهده شده (قرمز) سبب پنهان‌سازی pK_α' و pK_γ' می‌شود که برای مشاهده خیلی به یکدیگر نزدیک هستند. تیتراسیون این گروه‌های با خط آبی همپوشان نشان داده شده‌اند.

تیتراسیون یک اسید منوآمینو-دی‌کربوکسیلیک

اسید گلوتامیک مثال پیچیده‌تری است. همان‌طور که در اشکال ۱۶-۳ و ۱۷-۳ نشان داده شده است، در اسید گلوتامیک pK_a' گروه $\alpha-COOH$ برابر ۲٫۲، pK_a' گروه $\gamma-COOH$ برابر ۴٫۳، و pK_a' گروه $\alpha-NH_3^+$ برابر ۹٫۷ می‌باشد. شکل زویتریونی بعد از افزودن یک اکی‌والان باز به شکل با pH پایین تولید می‌شود و pH ایزوالکتریک (pI) از متوسط دو



شکل ۱۶-۳ اشکال یونی اسید گلوتامیک.

میزان تعیین‌کننده محدوده‌های شکل زویتریونی محاسبه می‌گردد.

$$pI=\frac{۲٫۲+۴٫۳}{۲}=۳٫۲۵$$

برهمین اساس، این ملکول در مقادیر pH بالای ۳٫۲۵ بار منفی دارد که در pH بالا، بار خالص آن ۲- می‌شود. اسید گلوتامیک در pH کمتر از ۳٫۲۵ بار مثبت دارد و در pH فوق‌العاده پایین به بار خالص ۱+ می‌رسد.

شکل ۶-۳ • مقادیر pI برخی پروتئین‌ها

Protein	pI
Pepsin	~۱
Human serum albumin	۵٫۹
α_1 - Lipoprotein	۵٫۵
Fibrinogen	۵٫۸
Hemoglobin A	۷٫۱
Ribonuclease	۷٫۸
Cytochrome c	۱۰٫۰
Thymohistone	۱۰٫۶

ارتباط عمومی بین خصوصیات باری اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها با pH

ارتباط بین pH و بار برای لوسین و گلوتامات عموماً برای سایر اسیدهای آمینه نیز صادق است. در pH کمتر از pI، ملکول بار مثبت دارد. در pH بیشتر از pI بار ملکول منفی است. شدت بار مثبت یا منفی تابعی از بزرگی تفاوت بین pH و pI است. از آنجایی که پروتئین‌ها پلی‌الکترولیت‌های پیچیده‌ای هستند که گروه‌های قابل یونیزاسیون زیادی دارند که شکل زویتریونی را تنظیم می‌کنند، محاسبه pH ایزوالکتریک پروتئین از مقادیر pK'_a و با استفاده از معادله هندرسن-هاسلباخ مشکل است. لذا مقادیر pI پروتئین‌ها به‌صورت تجربی با تعیین میزانی از pH صورت می‌پذیرد که در آن پروتئین در میدان الکتریکی حرکت نمی‌کند. مقادیر pI چند پروتئین در جدول ۶-۳ آورده شده است.

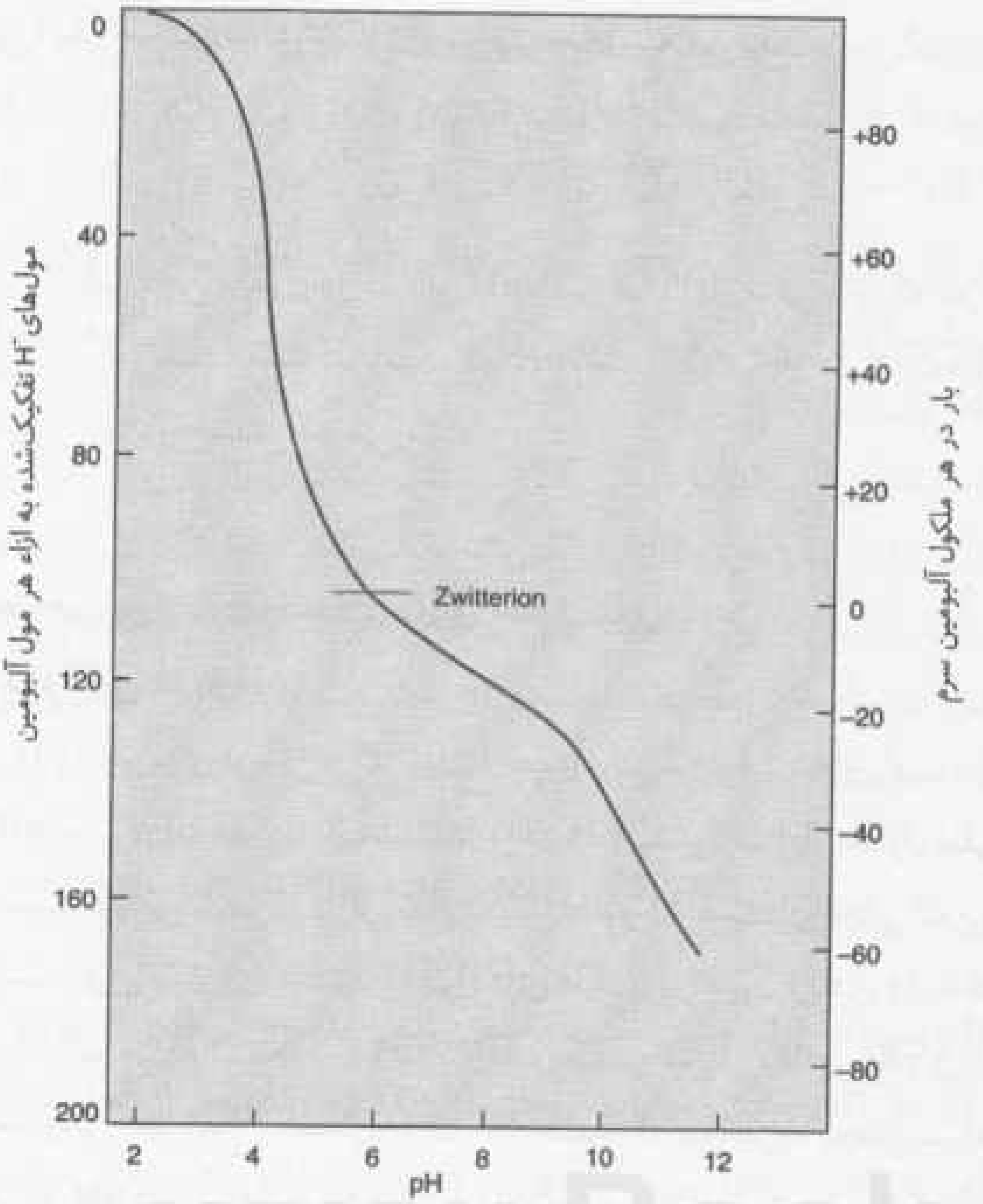
همانند حالت مربوط به اسیدهای آمینه، در pH بیش از pI، یک پروتئین بار خالص منفی دارد. در pH کمتر از pI آن، بار خالص پروتئین مثبت می‌باشد (شکل ۱۸-۳). بزرگی بار منفی با افزایش اختلاف بین pH و pI بیشتر می‌شود. برای مثال، آلبومین پلاسمایی انسان ۵۸۵ اسید آمینه دارد که شامل ۶ ریشه گلوتامات، ۳۶ آسپارتات، ۵۷ لیزین، ۲۴ آرژنین و ۱۶ هیستیدین است. منحنی تیتراسیون مربوطه در شکل ۱۹-۳ نشان داده شده است. pI آلبومین برابر ۵٫۹ می‌باشد که در آن pH بار خالص صفر است. در pH۷٫۵، گروه‌های ایمیدازولیوم مربوط به ریشه‌های هیستیدین به‌طور نسبی تیتر شده‌اند و یک بار منفی برابر ۱۰-وجود دارد. در pH ۸٫۶ این بار خالص حدود ۲۰- می‌باشد و در pH۱۱ حدود ۶۰- است. در pH ۳ بار خالص تقریبی برابر ۶۰+ است.

اسیدهای آمینه را می‌توان براساس تفاوت در pI آنها جدا نمود

تکنیک‌های الکتروفورز، تمرکز ایزوالکتریک و کروماتوگرافی تعویض یونی سبب جداسازی و شناسایی ملکول‌های بیولوژیکی براساس pI آنها می‌شوند (ص ۱۱۴). در پزشکی بالینی، جداسازی **پروتئین‌های پلاسمایی** منجر به طبقه‌بندی آنها براساس میزان حرکت الکتروفورتیک نسبی شده است. جداسازی پروتئین‌های پلاسمایی معمولاً در pH ۸٫۶

در pH بیشتر از pI، بار پروتئین منفی است
در pH کمتر از pI، بار پروتئین مثبت است

شکل ۱۸-۳ **ارتباط بین pH محلول، pI پروتئین و بار پروتئین.**



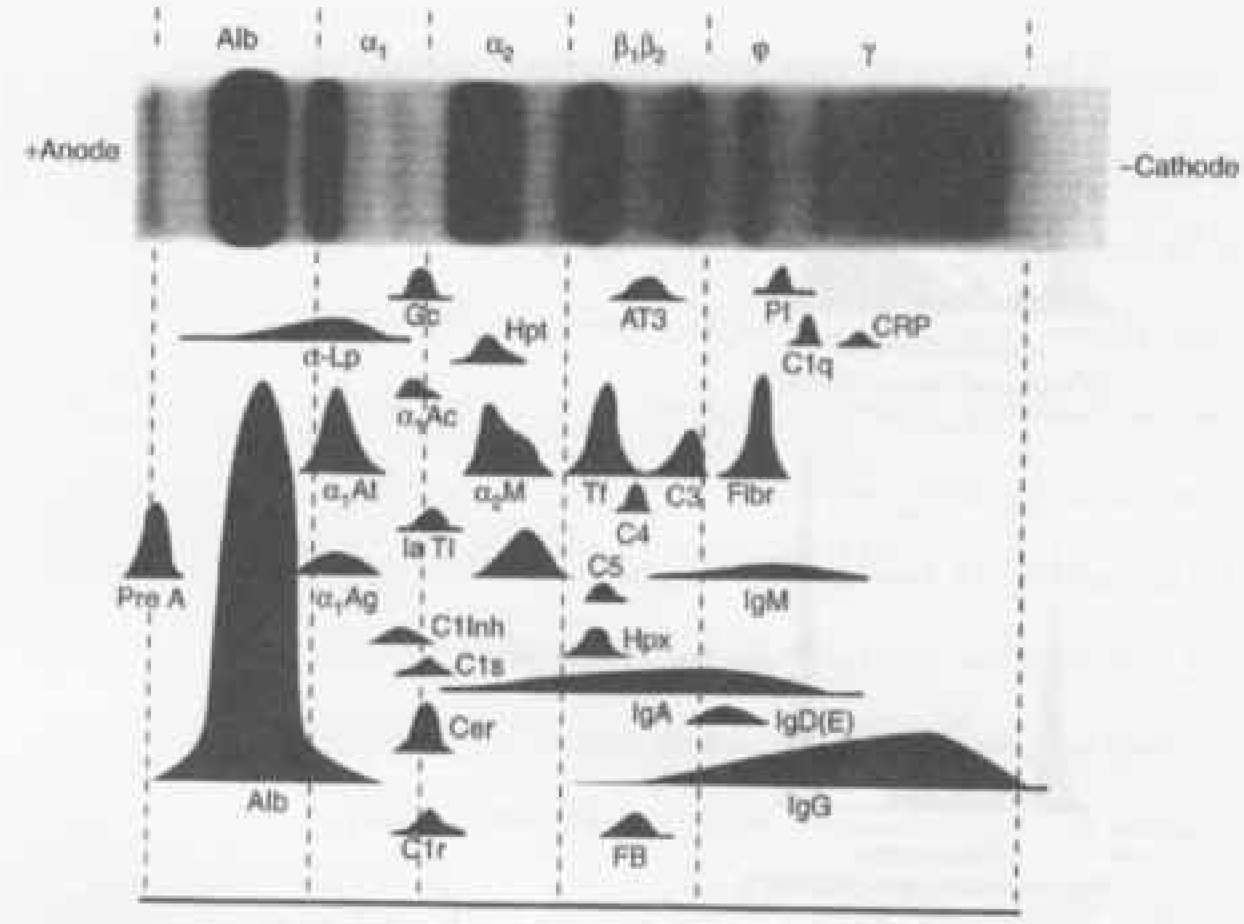
شکل ۱۹-۳ منحنی تیتراسیون آلبومین سرم انسان در ۲۵°C و قدرت یونی ۰/۱۵۰.

انجام می‌شود که بیش از میزان pI پروتئین‌های اصلی است. بر این اساس، پروتئین‌ها بار منفی دارند و برحسب بار خالص خود به‌سمت آند می‌روند. شکل ۲۰-۳ الکتروفورز پروتئین‌های پلاسمایی بر روی ژل آگارز در pH ۸/۶ را نشان می‌دهد که پروتئین‌ها را به پنج باند کلاسیک جدا می‌کند که از آن برای طبقه‌بندی پروتئین‌های پلاسمایی استفاده می‌شود. براساس ترتیب حرکت فراکسیون‌های اصلی شامل آلبومین، α_1، α_2، β و γ-گلبولین‌ها می‌باشند (شکل ۲۰-۳). برخی از این باندها حاوی ده‌ها تا صدها پروتئین مختلف هستند که حرکت مشابهی در pH ۸/۶ دارند. هرچند، در هر باند، تعدادی از پروتئین‌ها غالب هستند و تغییر میزان نسبی آنها از مشخصه‌های برخی بیماری‌ها است (اشکال-۲۰-۳ و ۲۱-۳، و ارتباط بالینی ۱-۳).

زنجیر جانبی اسیدهای آمینه، خصوصیات قطبی و غیرقطبی دارند

میزان آبگریزی[1] زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه برای تاشدن یک پروتئین به ساختمان بومی خود و برای پایداری پروتئین تاشده اهمیت زیادی دارد. شکل ۲۲-۳ نمودار میزان

1. Hydrophobicity

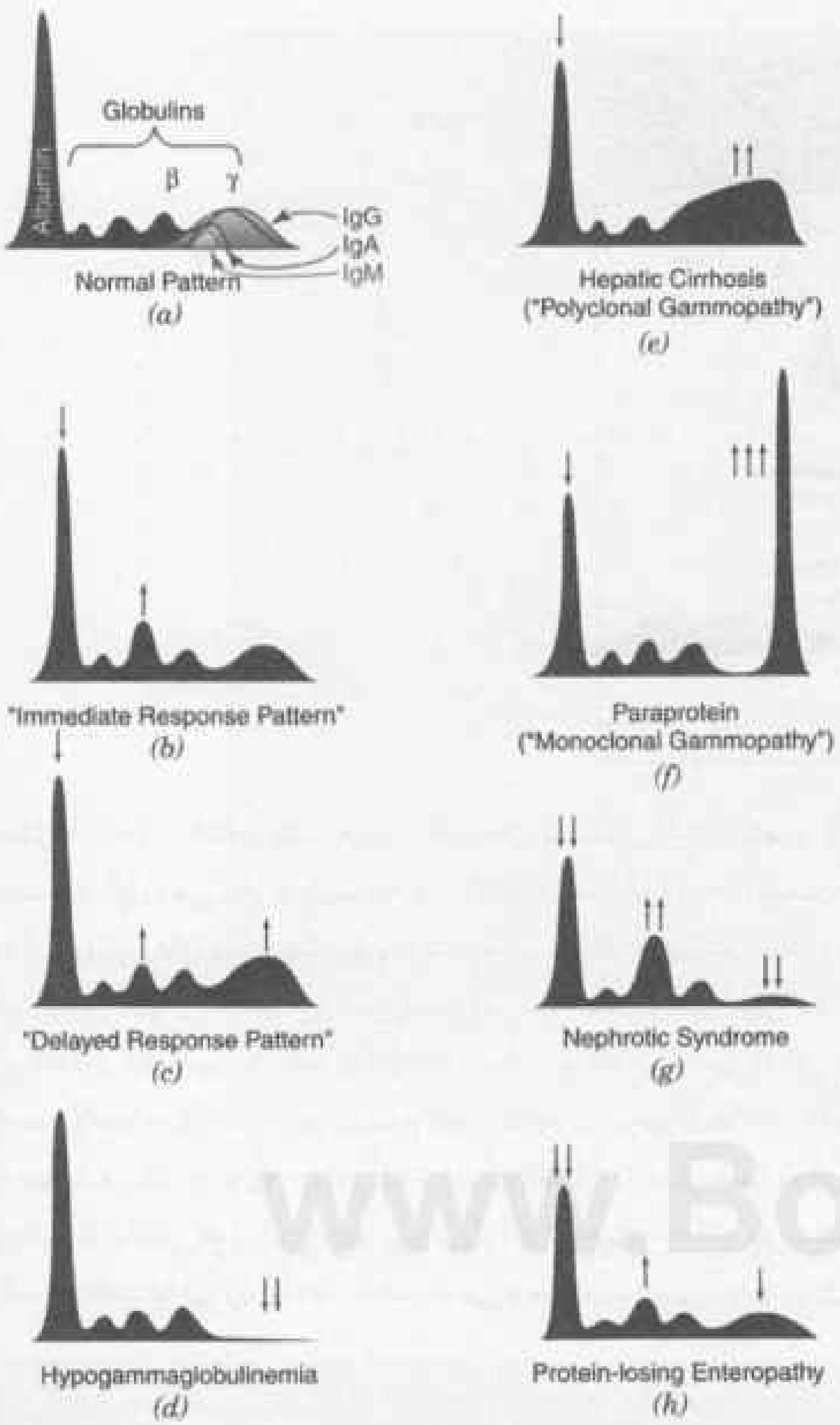


شکل ۲۰-۳ الگوی الکتروفورز پروتئین‌های پلاسمایی در ژل آگارز و pH ۸٫۶. حرکت در طول محور افقی از راست به چپ (کاتد به‌سمت آند) در طول محور افقی که در آن پروتئین‌های دارای بیشترین حرکت به آند نزدیک‌تر هستند. شدت باند در طول محور عمودی، غلظت پروتئین را نشان می‌دهد. پروتئین‌های اصلی مختلف در زیر قله‌های الکتروفورتیک خود نشان داده شده‌اند. ϕ قله فیبرینوژن را نشان می‌دهد که در پلاسما وجود دارد، ولی در سرم وجود ندارد. در برخی ژل‌ها، γ- گلبولین‌ها به صورت دو باند γ_1 و γ_2 جدا می‌شوند (در اینجا نشان داده نشده‌اند). در این شکل، پروتئین‌های اصلی که در این باندها بر روی ژل آگارز به میزان حداکثر می‌رسند، نشان داده شده‌اند. نواحی زیر قله‌ها، غلظت نسبی و موقعیت نسبی آنها را در ژل نشان می‌دهند. مخفف‌ها: $\alpha_1 Ac = \alpha_1$- آنتی‌کیموتریپسین، $\alpha_1 At = \alpha_1$- آنتی‌تریپسین؛ $\alpha_{2\text{-}M} = \alpha_2$- ماکروگلبولین؛ $\alpha\text{-Lp} = \alpha$- لیپوپروتئین؛ Alb= آلبومین؛ AT3= آنتی‌ترومبین III؛ $\beta\text{-Lp} = \beta$- لیپوپروتئین؛ اجزاء کمپلمان C1q، C1r، C1s، C3، C4 و C5 به‌همین شکل نشان داده شده‌اند؛ C1Inh = مهارکننده C1 استراز؛ Cer= سرولوپلاسمین؛ CRP= پروتئین واکنشگر C؛ Gc = Gc-گلبولین (پروتئین اتصالی ویتامین D)؛ FB = فاکتور B؛ Fibr = فیبرینوژن؛ Hpt = هاپتوگلوبین؛ Hpx = هموپکسین؛ ایمونوگلبولین‌های IgA، IgD، IgE، IgG و IgM به همین شکل نشان داده شده‌اند؛ IaTI = مهارکننده اینتر -α- تریپسین؛ Pl = پلاسمینوژن؛ PreA = پره‌آلبومین؛ و Tf = ترانسفرین.

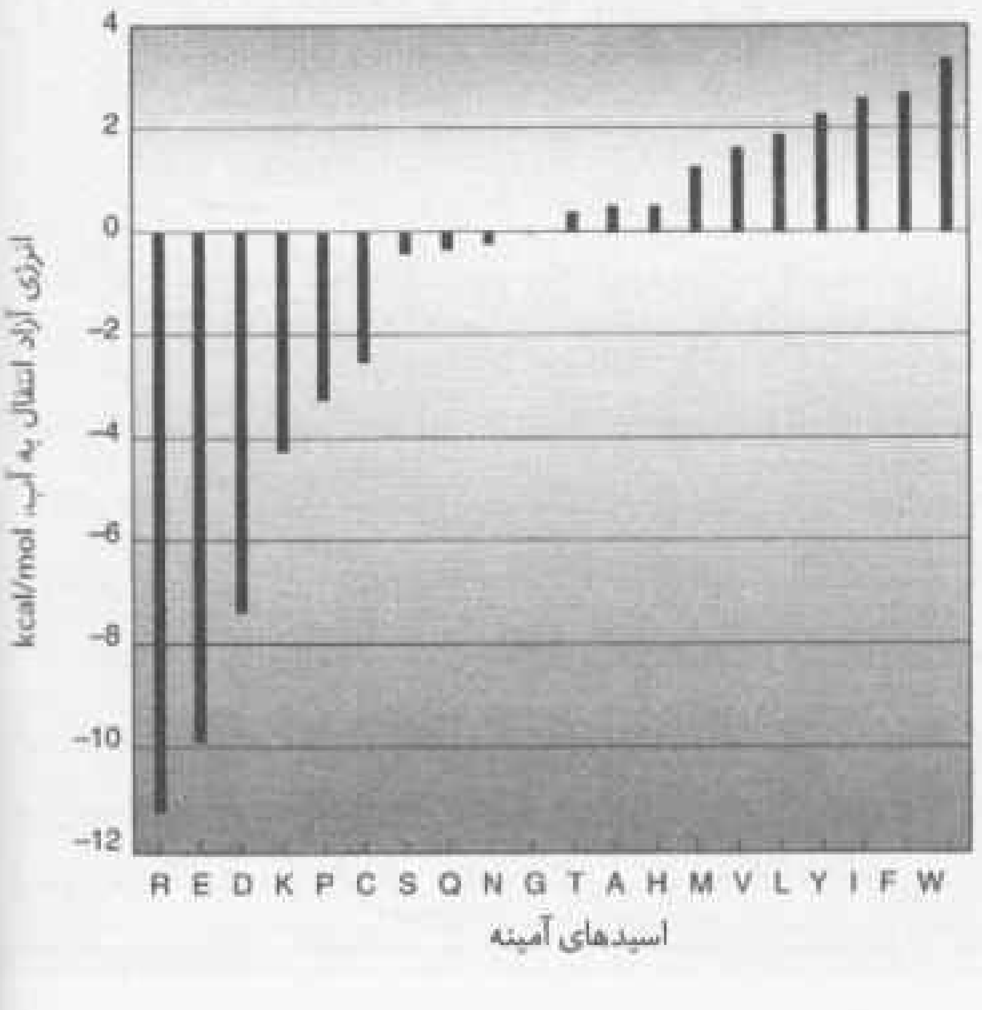
ارتباط بالینی ۱-۳

پروتئین‌های پلاسمایی در تشخیص بیماری‌ها

از آنالیز الکتروفورتیک پروتئین‌های پلاسمایی معمولاً برای تشخیص بیماری‌ها استفاده می‌شود. الکتروفور پلاسما در بافر pH ۸٫۶ سبب جداسازی پروتئین‌های اصلی می‌شود، زیرا طی حرکت آنها در میدان الکتروفورتیک به‌سمت آند، به دلیل تفاوت در بار خود، تولید باندها یا قله‌هایی می‌کنند. در شکل ۲۱-۳ مثال‌هایی از الگوهای غیرطبیعی الکتروفورز نشان داده شده‌اند. پاسخ فوری که به‌دنبال استرس یا التهاب حاصل از عفونت، یا ترومای جراحی پدیدار می‌شود، در الگوی (*b*) نشان داده است که در آن هاپتوگلوبین‌های باند حرکتی α_2 به‌طور انتخابی افزایش یافته‌اند. در الگوی (*c*) یک پاسخ تأخیری نشان داده شده است که در موارد عفونت مشاهده می‌گردد و منجر به افزایش قله‌های γ-گلبولین به دلیل افزایش ایمونوگلبولین‌ها می‌شود. مثالی از یک هیپو -γ-گلبولینمی ناشی از یک بیماری سرکوب‌کننده ایمنی در الگوی (*d*) نشان داده شده است. در سیروز کبدی، افزایش وسیع γ-گلبولین‌ها همراه با کاهش آلبومین وجود دارد که در الگوی (e) نشان داده شده است. گاموپاتی‌های منوکلونال حاصل سنتز کلونال یک ایمونوگلبولین بی‌همتا هستند و منجر به یک باند تیز γ-گلبولین همانند الگوی (*f*) می‌شوند. سندروم نفروتیک دفع انتخابی پروتئین‌های با وزن ملکولی پایین از پلاسما را همانند الگوی (g) نشان می‌دهد. این الگو کاهش آلبومین (۶۵ kDa) را به همراه افزایش باندهای متشکل از پروتئین‌های بزرگ α_2 ماکروگلبولین (۷۲۵ kDa) و β- لیپوپروتئین‌ها (۲۰۰۰ kDa) را نشان می‌دهد. الگوی (h) مربوط به بیماری با آنتروپاتی دفع‌کننده پروتئین است که پلاسما را از طریق ترشح اگزودا به داخل مجرای گوارش از دست می‌دهد. افزایش مختصر در باند α_2 در الگوی (h) ناشی از پاسخ فوری یا دیررس حاصل از یک محرک استرس‌زا است که قبلا در الگوهای (b) و (c) مشاهده شد.



شکل ۲۱-۳ الگوهای حرکت الکتروفورتیک که برای یک فرد طبیعی و بیماران با غلظت‌های پروتئینی غیرطبیعی به طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز آنالیز شده‌اند.



شکل ۲۲-۳ هیدروفوبیسیتی (خاصیت آبگریزی) نسبی زنجیرهای جانبی مربوط به اسیدهای آمینه. براساس تقسیم اسید آمینه بین حلال آلی و آب. مقادیر منفی برای ارجحیت آب و مقادیر مثبت برای ارجحیت حلال غیرقطبی (اتانل یا دیوکسان) نسبت به گلیسین می‌باشند (متن را ببینید).

آبگریزی اسیدهای آمینه براساس تمایل آنها در تقسیم در مخلوطی از آب و حلال غیرقطبی را نشان می‌دهد. مقیاس بر پایه میزان صفر برای گلیسین می‌باشد. زنجیرهای جانبی که نسبت به گلیسین، ترجیحاً در حلال غیرقطبی حل می‌شوند، میزان آبگریزی مثبت (+) را نشان می‌دهند و هرچه اینها مثبت‌تر باشند، تمایل به حلال غیرقطبی بیشتر می‌باشد. در ساختمان‌های پروتئینی تاشده، اکثریت اسیدهای آمینه آبگریز به دور از حلال آبی که با سطح یک ملکول محلول تعامل می‌کنند، در داخل مدفون می‌شوند. هرچند، به‌دلیل ماهیت آمفوتری بسیاری از اسیدهای آمینه‌ای که قسمت‌های قطبی‌تر ساختمان زنجیر جانبی خود را در نزدیک سطح برای تعامل با آب قرار می‌دهند، این ارتباط کامل نیست. به‌علاوه، برخی زنجیرهای جانبی غیرقطبی ممکن است در سطح قرار داشته باشند. هرچند، وقتی گروه‌های آبگریز در سطح قرار دارند، عموماً در میان زنجیرهای جانبی قطبی پخش می‌شوند. وقتی تجمع زنجیرهای جانبی غیرقطبی در سطح وجود دارد، معمولاً مرتبط با فعالیتی نظیر فراهم‌سازی جایگاهی برای اتصال ملکول‌های سوبسترا از طریق تعاملات آبگریز هستند.

بیشتر زنجیرهای جانبی باردار در سطح پروتئین‌های گلبولی محلول قرار دارند و در این محل از طریق تعاملات مساعد انرژتیک با آب تثبیت می‌شوند. قرارگیری نادر یک زنجیر جانبی باردار در داخل معمولاً به معنی نقش عملکردی مهم برای آن بار مدفون‌شده در بخش داخلی غیرقطبی در جهت تثبیت کونفورماسیون یا شرکت در کاتالیز می‌باشد.

در پروتئین‌های عرض‌غشایی[1]، موقعیت زنجیر جانبی قطبی متفاوت از این موقعیت در پروتئین‌های گلبولی محلول در آب است. در داخل غشاء، این پروتئین‌ها اغلب زنجیرهای جانبی آبگریز را در خارج و گروه‌های یونی را در داخل قرار می‌دهند تا تعاملات اتصالی را سبب شده و تولید کانال‌های یونی کنند (ص ۶۴۷).

اسیدهای آمینه متحمل واکنش‌های شیمیایی مختلفی می‌شوند

اسیدهای آمینه موجود در پروتئین‌ها با معرف‌های مختلفی واکنش می‌کنند که ممکن است از آنها در بررسی عملکرد زنجیرهای جانبی اختصاصی استفاده شود. برخی واکنش‌های شیمیایی معمول در جدول ۷-۳ آورده شده‌اند. معرف‌هایی ساخته شده‌اند که زنجیرهای جانبی را تغییر می‌دهند تا به جایگاه‌های اختصاصی موجود در ساختمان پروتئین، نظیر جایگاه اتصال به سوبسترا، اتصال یابند. راهکار ایجاد خصوصیات ساختمانی سوبسترای طبیعی آنزیم در داخل معرف تغییردهنده می‌باشد. این معرف همانند سوبسترای طبیعی به جایگاه فعال اتصال یافته و با یک زنجیر جانبی اختصاصی واکنش می‌کند. بدین ترتیب اسید آمینه تغییریافته موجود در جایگاه اتصال به سوبسترا شناسایی می‌شود که به تعیین نقش آن در کاتالیز کمک می‌کند.

1. Transmembrane

جدول ۷-۳ • واکنش‌های شیمیایی اسیدهای آمینه

گروه واکنشگر	معرف یا واکنش	محصول
گروه‌های آمین $(-NH_2)$	نین‌هیدرین	محصول آبی رنگی که در ۴۵۰ nm جذب نوری دارد[1]
	فلورسکامین	محصولی که فلورسانس دارد
گروه‌های اسید کربوکسیلیک	الکل‌ها	محصولات استر
	آمین‌ها	محصولات آمینی
	کربودیمید	واکنش با نوکلئوفیل‌ها را فعال می‌کند
NH_2–لیزین	۲،۴،۶-تری‌نیتروبنزن سولفونات	محصولی که در ۳۶۷ nm جذب دارد
	انیدریدها	آمین‌های استیلات
	آلدئیدها	تولید اداکت‌های باز شیف
گروه گوانیدینو آرژینین	واکنش ساکاگوچی	محصول صورتی-قرمز که می‌تواند برای آزمایش آرژینین به‌کار رود
فنل تیروزین	I_2	یدیناسیون موقعیت‌های اورتو به گروه هیدروکسیل بر روی حلقه آروماتیک
	انیدرید استیک	استیلاسیون $OH-$
اتم گوگرد زنجیر جانبی متیونین	CH_3I	محصول متیل سولفونیوم
	H_2O_2 یا $[O^-]$	متیونین سولفوکسید یا متیونین سولفون
سولفیدریل سیستئین	یدواستات	اتر تیول کربوکسی‌متیل
	N-اتیل مال‌ایمید	افزودن محصول با S
	مواد آلی جیوه	اداکت‌های جیوه
	اسید پرفورمیک	اسید سیستئیک $(-SO_3H)$
	اسید دی‌نیتروبنزوئیک	محصول زردی که از آن می‌توان برای تعیین مقدار گروه‌های $SH-$ استفاده کرد
فنل تیروزین و ایمیدازول هیستیدین	معرف پائولی	محصول زرد تا مایل به قرمز

[1] گروه ایمینوی پرولین با نین‌هیدرین تولید محصولی می‌کند که در ۴۴۰ nm جذب نوری دارد (رنگ زرد).

۳-۴ • ساختمان اول پروتئین‌ها

ساختمان اول یک پروتئین اشاره به ساختمان کووالان آن دارد که شامل توالی اسید آمینه‌ای و موقعیت پیوند دی‌سولفیدی (سیستینی) می‌باشد. ساختان اول یک پروتئین برای شناخت ساختمان و مکانیسم عمل، بیوسنتز شامل تغییرات بعد از سنتز آن، و ارتباط آن با سایر

پروتئین‌های دارای نقش‌های فیزیولوژیک مشابه لازم است. ساختمان اول چندین پپتید دارای فعالیت بیولوژیک در جدول ۲-۳ نشان داده شده است. **انسولین** نشان می‌دهد که چطور شناخت ساختمان اول منجر به شناخت بیوسنتز و اشکال فیزیولوژیک این هورمون دارای فعالیت بیولوژیکی می‌شود (شکل ۲۳-۳؛ یک نگاه نزدیک ۱-۳ و ارتباط بالینی ۸-۲۱). انسولین در ابتدا به‌صورت پروانسولین سنتز می‌شود که یک زنجیر پلی‌پپتیدی با ۸۶ اسید آمینه و سه پیوند سیستینی بین‌زنجیری است (شکل ۲۳-۳). این شکل هورمون متشکل از دو زنجیر پلی‌پپتیدی (A و B) می‌باشد که از طریق دو پیوند سیستینی به یکدیگر اتصال دارند و زنجیر A یک سیستین درون‌زنجیری دارد. این ساختمان اول یا کووالان انسولین فعال است.

غیر از اطلاعات مربوط به بیوسنتز آن، مقایسه ساختمان‌های اول انسولین‌های مربوط به گونه‌های حیوانی مختلف، ریشه‌های ضروری و غیرضروری برای فعالیت هورمونی آن را نشان می‌دهند. در ساختمان اول به‌صف‌درآمده[1]، یکسانی توالی در اکثر موقعیت‌های اسید آمینه‌ای، غیر از ریشه‌های ۸، ۹ و ۱۰ زنجیر A و ریشه ۳۰ زنجیر B وجود دارد. اسیدهای آمینه موجود در این موقعیت‌ها تفاوت زیادی با یکدیگر دارند (جدول ۸-۳) و به‌طور واضح اثری بر روی خصوصیات بیولوژیکی ندارند (ارتباط بالینی ۲-۳). سایر ریشه‌ها بندرت جایگزین می‌شوند که نقش اساسی آنها در فعالیت را مطرح می‌کند.

از مقایسه توالی اغلب برای پیش‌بینی شباهت ساختمانی و عملکردی بین پروتئین‌ها

یک نگاه دقیق‌تر ۱-۳

تجزیه پروتئولیتیک پروانسولین

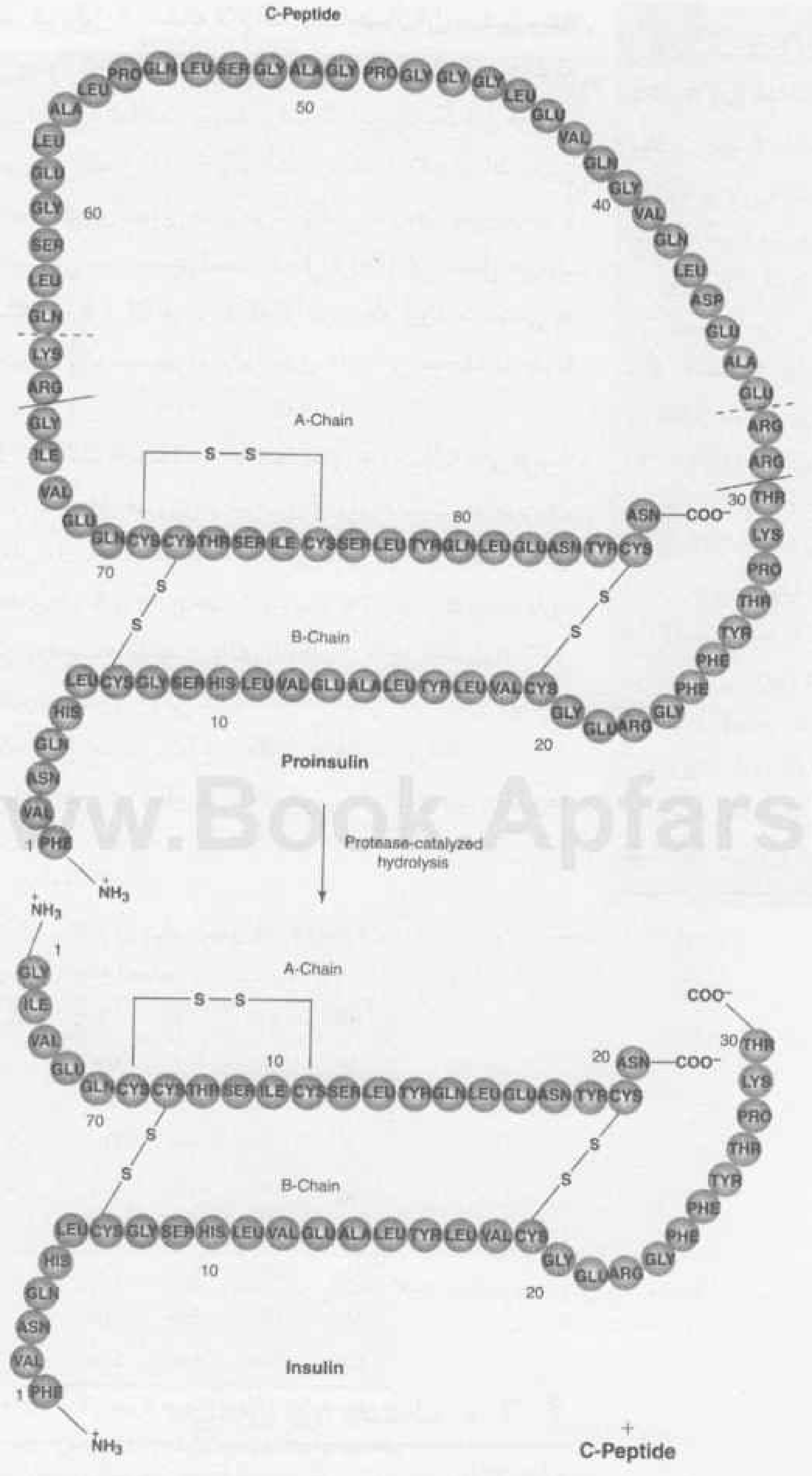
پروانسولین توسط سلول‌های جزایر پانکراس به‌صورت یک زنجیر پلی‌پپتیدی حاوی ۸۶ اسید آمینه و ۳ پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیری تولید می‌شود (شکل ۲۳-۳). قبل از ترشح از سلول‌های جزایر، این زنجیر با تجزیه پروتئولیتیک انسولین بالغ دارای فعالیت بیولوژیک تغییر پیدا می‌کند. پروانسولین توسط پروتئازهای موجود در سلول‌های جزایر، بین ریشه‌های ۳۰ و ۳۱ و بین ۶۵ و ۶۶ شکسته می‌شود. دو ملکول آزاد می‌شوند، یک قطعه با ۳۵ ریشه (پپتید C) و انسولین متشکل از دو زنجیر پلی‌پپتیدی (A و B) به ترتیب با ۲۱ و ۳۰ اسید آمینه که توسط همان پیوندهای دی‌سولفیدی موجود در پروانسولین به یکدیگر اتصال دارند. پپتید C توسط پروتئازهایی که یک دی‌پپتید بازی را از دو انتهای آمینو و کربوکسیل هیدرولیز می‌کنند، بیشتر پردازش می‌شود. این پپتید C تغییر یافته همراه با انسولین ترشح می‌شود.

جدول ۸-۳ • تنوع در موقعیت‌های A8، A9، A10، و B30 انسولین

گونه	A8	A9	A10	B30
انسان	Thr	Ser	Ile	Thr
گاو	Ala	Ser	Val	Ala
خوک	Thr	Ser	Ile	Ala
گوسفند	Ala	Glu	Val	Ala
اسب	Thr	Glu	Ile	Ala
سگ	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
مرغ[1]	His	Asn	Thr	Ala
اردک	Glu	Asn	Pro	Thr

[1] موقعیت‌های ۱ و ۲ زنجیر B در مرغ و اردک Ala هستند، در حالی‌که در سایر گونه‌هایی که در جدول آورده شده‌اند، موقعیت‌های ۱ و ۲ زنجیر B به‌ترتیب Phe و Val می‌باشند.

1. Aligne



شکل ۲۳-۳ ساختمان‌های اول مربوط به پروانسولین، انسولین و پپتید C انسان. در توالی پلی‌پپتیدی پروانسولین، زنجیر ابتدایی B از فنیل‌آلانین ۱ تا ترئونین موقعیت ۳۰، پپتید C از آرژنین موقعیت ۳۱ تا Arg موقعیت ۶۵، و پپتید A از گلیسین موقعیت ۶۶ تا آسپارازین ۸۶ امتداد دارد. پیوندهای سیستینی از موقعیت‌های ۷ به ۷۲، ۱۹ به ۸۵، و ۷۱ به ۷۶ در پروانسولین وجود دارند.

ارتباط بالینی ۲-۳

تفاوت‌های موجود در بین انسولین مورد استفاده در درمان دیابت قندی

قبل از پیدایش انسولین نوترکیب انسانی، از انسولین‌های خوک و گاو برای درمان مبتلایان به دیابت استفاده می‌شد. در کشورهای در حال توسعه همچنان از انسولین حیوانی برای درمان دیابت استفاده می‌شود. به‌دلیل وجود اختلاف با توالی انسولین انسانی، برخی بیماران پاسخ گذرایک ابتدایی را نسبت به تزریق انسولین نشان می‌دهند، زیرا سیستم ایمنی آنها انسولین را به‌عنوان یک ماده خارجی شناسایی نموده و یا دچار نوعی مقاومت به انسولین به دلیل وجود تیتر بالای آنتی‌بادی ضدانسولین در مراحل دیررس درمان می‌شوند. هرچند، فراوانی پاسخ ایمونولوژیکی زیان‌آور نسبت به انسولین‌های خوکی و گاوی کم است؛ اکثر افراد قادر به مصرف این انسولین‌ها بدون هیچ نوع مشکلی هستند. این موضوع به‌دلیل تعداد کم و ماهیت حفظ‌شده تغییرات بین توالی‌های اسید آمینه‌ای و این واقعیت است که این تغییرات منجر به تغییر قابل توجه ساختمان سه- بُعدی انسولین نسبت به انسولین انسانی نمی‌شود. در افرادی که نسبت به انسولین واکنش می‌دهند، در مقایسه با انسولین گاوی، معمولاً انسولین خوکی بیشتر مورد قبول است، زیرا از نظر توالی شباهت بیشتری با انسولین انسانی دارد (جدول ۸-۳ را ببینید). هم اکنون در کشورهای توسعه‌یافته از انسولین انسانی استفاده می‌شود که در باکتری‌هایی که به‌طریق ژنتیکی مهندسی شده‌اند و یا توسط انسولین خوکی تغییریافته ساخته شده است.

استفاده می‌شود. این مقایسه‌ها به‌طور معمول نیاز به صف‌بندی توالی‌ها برای به حداکثر رساندن تعداد ریشه‌های مشابه و به حداقل رساندن تعداد الحاق‌ها و حذف‌ها برای رسیدن به این صف‌بندی دارد. وقتی دو توالی شدیداً قابل صف‌بندی هستند، آنها را **هُمولوگوس** گویند. توجه داشته باشید که هُمولوژی در کاربرد صحیح خود تنها اشاره به پروتئین‌هایی دارد که از یک ژن تولید شده‌اند. **آنالوژی** توالی‌هایی از پروتئین‌هایی را شرح می‌دهد که از نظر ساختمانی مشابه هستند، ولی برای آنها هیچ ارتباط تکاملی نشان داده نشده است. جایگزینی یک اسید آمینه توسط اسید آمینه‌ای با قطبیت مشابه (یعنی، Val به‌جای موقعیت ۱۰ انسولین) یک جایگزینی **حفظ‌شده**[1] است و معمولاً در توالی‌هایی از یک پروتئین و از گونه‌های حیوانی مختلف مشاهده می‌گردد. در صورتی که یک اسید آمینه خاص به‌طور منظم در یک موقعیت یافت شود، به‌عنوان یک **ریشه ثابت**[2] می‌باشد. می‌توان تصور نمود که این ریشه‌ها یک نقش اساسی در ساختمان یا عملکرد پروتئین دارند. یک جایگزینی **حفظ‌نشده**[3] مستلزم جابه‌جایی یک اسید آمینه با یک اسید آمینه دارای قطبیت متفاوت می‌باشد. این جابه‌جایی ممکن است به‌میزان قابل توجهی خصوصیات پروتئین را تغییر داده و یا در نواحی رخ دهد که از نظر عملکرد مهم نمی‌باشد (ارتباط بالینی ۲-۶ را ببینید). قطبیت تنها یک خصوصیت فیزیکی اسیدهای آمینه است که تعیین می‌کند آیا یک جایگزینی اثر برجسته‌ای بر روی عملکرد پروتئین دارد یا خیر. سایر خصوصیات مهم شامل حجم ملکولی و ناحیه سطحی ریشه می‌باشند.

1. Conservative 2. Invariant residue 3. Nonconservative

۵-۳ • سطوح-بالاتر سازماندهی پروتئین

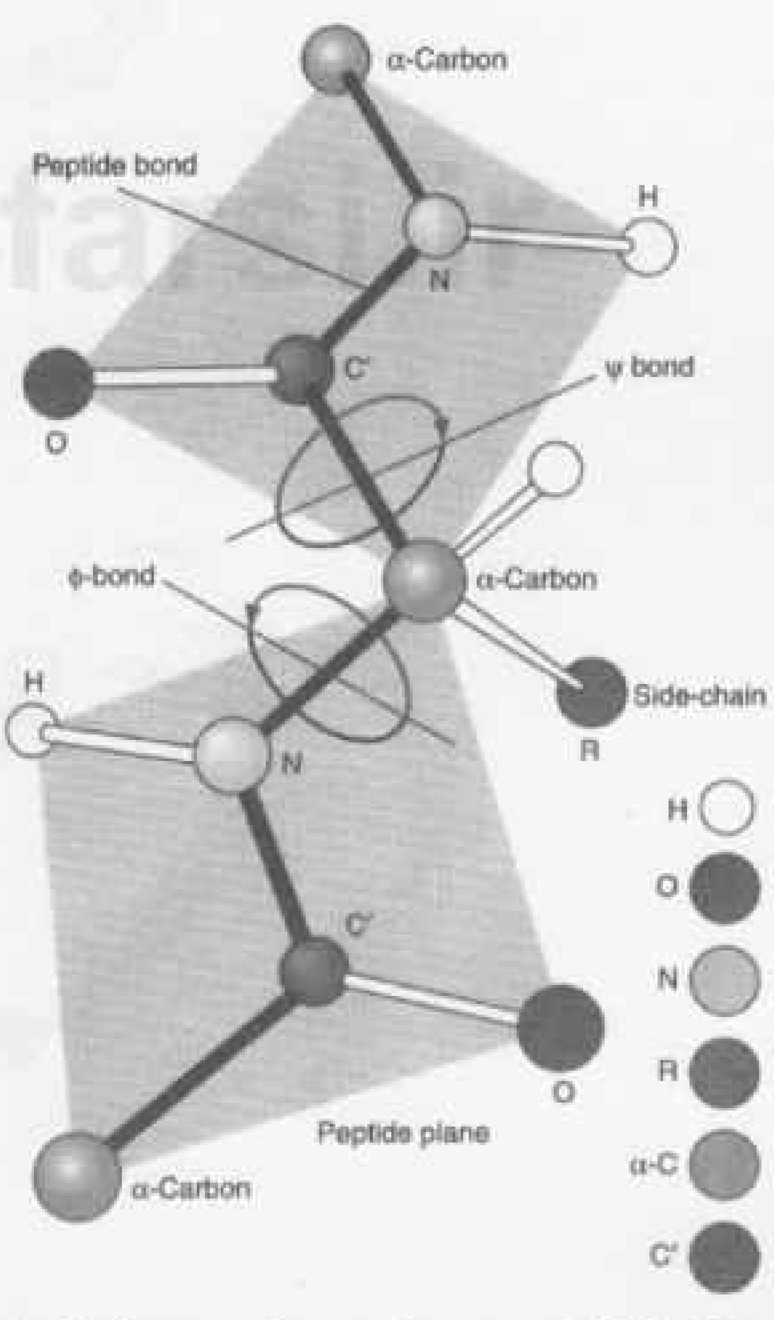
سطوح بالاتر سازماندهی پروتئین اشاره به کونفورماسیون‌هایی از زنجیر پلی‌پپتیدی دارند که به طریق غیرکووالان تولید می‌شوند. این سطوح بالاتر سازماندهی پروتئین را ساختمان‌های دوم، سوم و چهارم می‌گویند. ساختمان دوم اشاره به تاشدن موضعی اسکلت پلی‌پپتیدی به کونفورماسیون‌های مارپیچی، صفحه‌ای یا تصادفی دارد. اسکلت پلی‌پپتیدی شامل اتم‌های مربوط به پیوندهای پپتیدی که به‌طور کووالان به یکدیگر اتصال دارند و کربن‌های α متصل‌کننده ریشه‌های اسید آمینه پروتئین می‌باشند. زنجیرهای جانبی در سطح دوم مورد توجه قرار ندارند. ساختمان سوم اشاره به ساختمان سه-بُعدی پلی‌پپتید دارد. این ساختمان شامل ارتباطات کونفورماسیونی در فضای زنجیرهای جانبی و ارتباط هندسی بین نواحی دور موجود در پلی‌پپتید است. ساختمان چهارم اشاره به پیوستن غیرکووالان زیرواحدهای پلی‌پپتیدی مجزا بـه یک پروتئین چند زیرواحدی دارد. تمامی پـروتئین‌ها ساختمان چهارم ندارند.

پروتئین‌ها عموماً کونفورماسیون‌های بی‌همتای دوم، سوم و چهارم را اتخاذ می‌کنند تا **کونـفورماسیون بومی**[1] پروتئین را به‌وجود آورنـد. در اکثر موارد، تـاشدن ساخـتمان اول به کونفورماسیون بومی به‌طور خودبه‌خودی و از طریق تعاملات غیرکووالان انجام می‌شود. این کونفورماسیون یکی از کونفورماسیون‌های دارای کمترین انرژی آزاد گیبس است که از نظر کینتیکی برای پلی‌پپتید(ها) در شرایط خاص قدرت یونی، pH و درجه حرارت تاشدن، قابل دسترسی است. در سلول، پروتئین‌های چاپرون (ص ۳۱۵) می‌توانند تاشدن پروتئینی را تسهیل کنند.

ساختمان دوم

کونفورماسیون یک اسکلت پلی‌پپتیدی ممکن است براساس زوایای چرخشی پیوندهای کووالان مربوط به زنجیر شرح داده شود. هر کدام از این زوایا به کمک اسیدهای آمینه ایجاد شده و بین نیتروژن و کربن α، و همچنین کربن α و کربن کربونیل می‌باشند. اولین پیوند را **پیوند فی** (ϕ)[2] و دومی را **پیوند سای**[3] (ψ) گویند (شکل ۲۴-۳). سومین پیوند موجود در زنجیر پلی‌پپتیدی هر کدام از اسیدهای آمینه در ایجاد آن همکاری دارند، پیوند پپتیدی است. همان‌طور که قبلا مورد بحث قرار گرفت، به‌دلیل خصوصیت پیوند دوگانه نسبی پیوندهای $N—C'$، مانعی برای چرخش آزاد حول این پیوند پپتیدی وجود دارد.

ساختمان دوم منظم در قطعاتی از یک زنجیر پلی‌پپتیدی به‌وجود می‌آید که در آن تمامی زوایای پیوندی ϕ و تمامی زوایای پیوندی ψ برابر هستند. زوایای چرخشی مربوط به پیوندهای ϕ و ψ برای ساختمان‌های دوم منظم معمول در جدول ۹-۳ آورده شده‌اند.



شکل ۲۴-۳ زنجیر پلی‌پپتیدی که پیوندهای ϕ، ψ و پپتیدی را برای ریشه Ri در داخل یک زنجیر پلی‌پپتیدی نشان می‌دهد.

1. Native conformation 2. Phi bond 3. Psi bond

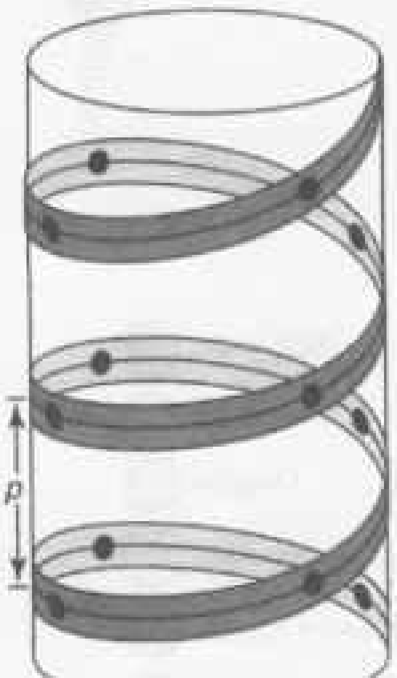
جدول ۹-۳ • پارامترهای مربوط به ساختمان‌های دوم منظم

ساختمان	زوایای پیوندی احتمالی ϕ	ψ	تعداد (n) ریشه در هر دور	گام (p) مارپیچ[1] ($\AA$)
مارپیچ α راست‌گردان (مارپیچ $۳٫۶_{۱۳}$)	-۵۷	-۴۷	۳٫۶	۵٫۴
مارپیچ $۳_{۱۰}$	+۴۹	-۲۶	۳٫۰	۶٫۰
رشته β موازی همسو	-۱۱۹	+۱۱۳	۲٫۰	۶٫۴
رشته β موازی ناهمسو	-۱۳۹	+۱۳۵	۲٫۰	۶٫۸
پلی‌پرولین نوع II[2]	- ۷۸	+۱۴۹	۳٫۰	۹٫۴

[1] فاصله بین پیچ‌های تکراری بر روی یک خط موازی با محور مارپیچ.
[2] نوع مارپیچ یافت شده در زنجیرهای پلی‌پپتیدی کلاژن.

کونفورماسیون‌های مارپیچ α و رشته β پلی‌پپتیدها پایدارترین ساختمان‌های دوم منظم می‌باشند. هرچند، یک توالی خاص ممکن است یک ساختمان دوم بی‌نظم یا تصادفی داشته باشد که در آن هیچ‌کدام از زوایای پیوندی ϕ و زوایای پیوندی ψ برابر نیستند. پرولین کونفورماسیون مارپیچی α را بر هم می‌زند، زیرا زنجیر جانبی پیرولیدین آن با ریشه قبلی تعامل فضایی داشته و مانع تولید یک ساختمان مارپیچی α می‌شود.

ساختمان‌های مارپیچی توسط تعداد n ریشه‌ها در هر دور مارپیچ و فاصله d بین اتم‌های کربن α اسیدهای آمینه مجاور تعیین می‌گردد که موازی با محور مارپیچ اندازه‌گیری می‌شود. گام[1] مارپیچ p، حاصلضرب $n \times d$، فاصله بین دورهای تکراری مارپیچ موجود بر روی یک خط رسم شده موازی با محور، را اندازه‌گیری می‌کند (شکل ۲۵-۳).



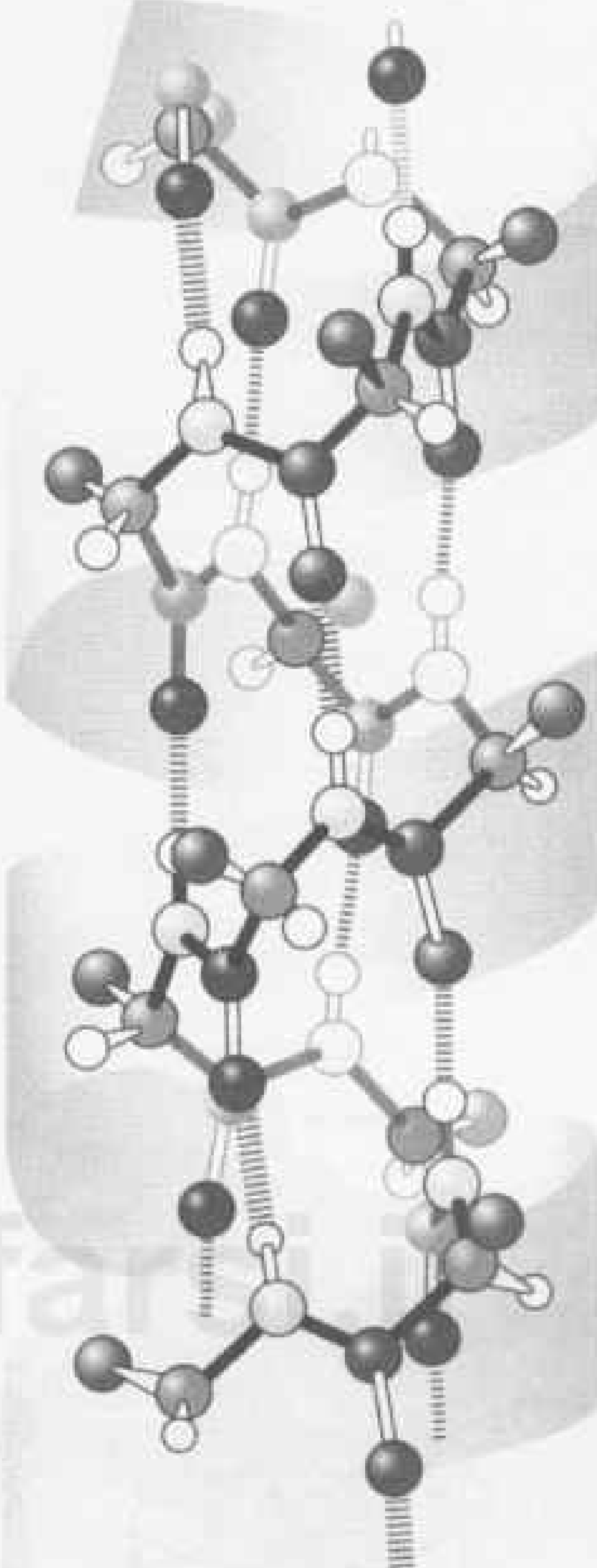
شکل ۲۵-۳ گام مارپیچ (p) برای مارپیچی با ۴ = n. هر دایره موجود بر روی خط اشاره به یک کربن – α از یک ریشه اسید آمینه دارد. افزایش ارتفاع به ازاء هر ریشه p/n خواهد بود.

ساختمان مارپیچی α

یک توالی اسید آمینه‌ای با کونفورماسیون مارپیچی α راست‌گردان در شکل ۲۶-۳ نشان داده شده است. مشخصه این مارپیچ وجود ۳٫۶ اسید آمینه در دور ۳۶۰ درجه‌ای است ($n = ۳٫۶$). صفحات پیوند پپتیدی موازی با محور مارپیچ می‌باشند. با این هندسه، هر پیوند پپتیدی دو پیوند هیدروژنی ایجاد می‌کند که یکی از آنها با پیوند پپتیدی ریشه چهارم در بالا و دیگری به پیوند پپتیدی اسید آمینه چهارم در پایین می‌باشد. پارامترهای دیگر، نظیر گام p نیز در جدول ۹-۳ آورده شده‌اند. در پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های پپتیدی، فاصله بین اتم دهنده هیدروژن و اتم گیرنده هیدروژن برابر ۲٫۹Å است. به علاوه، دهنده، گیرنده و اتم‌های هیدروژن تقریباً در یک خط مستقیم قرار دارند. این هندسه و فاصله برای حداکثر قدرت پیوند هیدروژنی مطلوب می‌باشد (قسمت ۷-۳).

زنجیرهای جانبی در خارج این ساختمان فنری قرار دارند. به‌واسطه وجود ۳٫۶ اسید

1. Pitch



شکل ۲۶-۳ یک مارپیچ – α.

آمینه در هر دور، اولین و هر کدام از گروه‌های R سوم و چهارم توالی اسید آمینه‌ای موجود در مارپیچ در نزدیکی یکدیگر قرار می‌گیرند. در صورتی‌که توالی اسید آمینه‌ای طوری باشد که گروه‌های R قطبی و غیرقطبی به اندازه سه یا چهار ریشه از یکدیگر جدا باشند، این مارپیچ‌ها اغلب دو سمت قطبی و غیرقطبی دارند. این موضوع مشخصه عملکردی بی‌همتایی را بـه مارپیچ می‌دهد. هرچند، اگر زنجیرهای جانبی سوم و چهارمی که در کنـار یکدیگر قرار می‌گیرند، بار مشابهی داشته باشند و یا در محل کربن β شاخه‌دار باشند (والین و لوسین)، تعاملات یونی یا فضایی نامساعد سبب ناپایداری ساختمان مارپیچ می‌شوند. مارپیچ α ممکن است از نظر تئوری راست‌گردان یا چپ‌گردان باشد که به آن خصوصیات نـامتقارن و فعالیت نوری منـاسب را می‌دهد. یک مارپیچ α راست‌گردان پایدارتر از یک مارپیچ چپ‌گردان است.

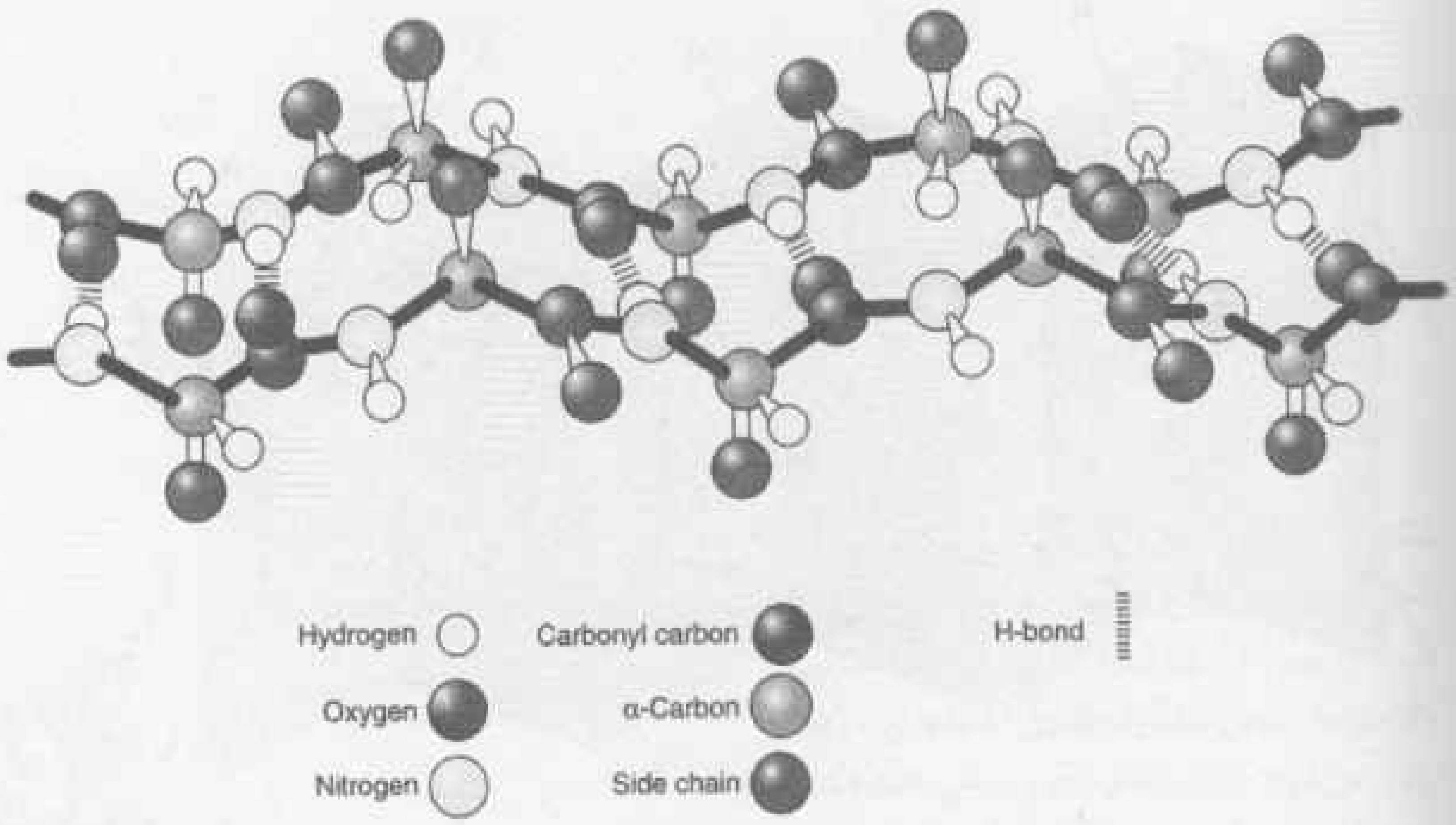
ساختمان β

یک زنجیر پلی‌پپتیدی با ساختمان β (شکل ۲۷-۳) پیوند هیدروژنی با ناحیه پلی‌پپتیدی مشابه دیگری دارد که بـا آن موازی همسو یـا موازی ناهمسو می‌باشد (شکل ۲۸-۳). رشته‌های β دارای پیوند هیدروژنی به‌صورت صفحات پلیسه‌ای[1] به‌نظر می‌رسند (شکل-۲۹-۳). زنجیرهای جانبی به بالا و پایین ساختمان صفحه پلیسه‌ای امتداد می‌یابند.

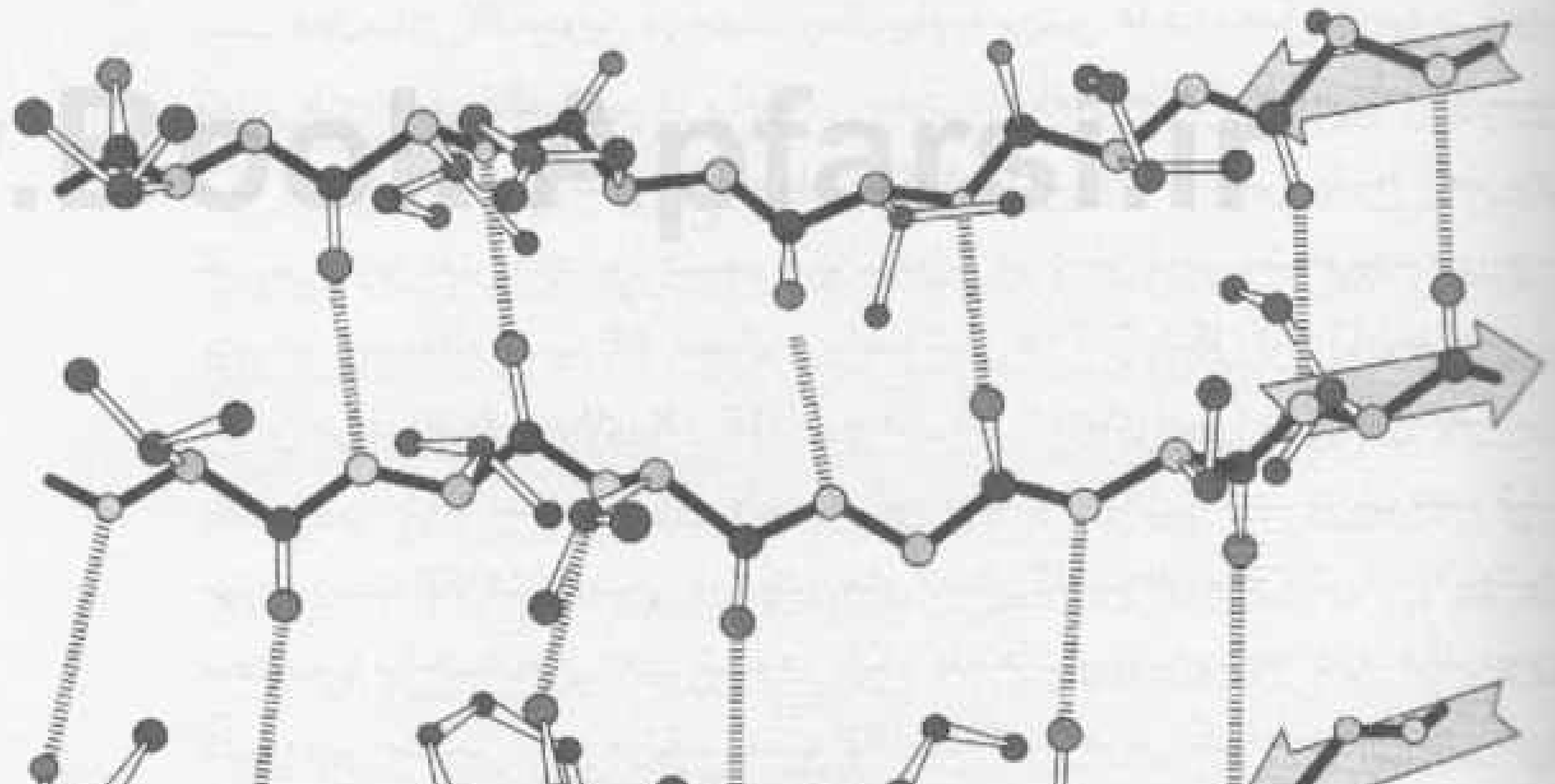
موتیف‌های ساختمانی و فولدهای پروتئینی

آرایش‌های ساده ساختمان دوم که در بیش از یک پروتئین دیده می‌شوند را **موتیف‌های ساختمانی**[2] گویند. اینها شامل موتیف مـارپیچ-پیچ-مـارپیچ موجود در بسیاری از پـروتئین‌های اتصالی DNA، موتیف رشته-پیچ-رشته موجود در پـروتئین‌های دارای ساختمان β موازی نـاهمسو، و موتیف رشته-پیچ-مارپیچ-پیچ-رشته متناوب موجود در بسیـاری از پروتئین‌های α/β می‌باشد. در این موتیف‌ها یک پیچ قطعه کوچکی از پلی‌پپتید (حدود سه یا چهار ریشه) با ساختمان دوم نامنظم می‌باشد که نواحی از ساختمان دوم منظم را به یکدیگر متصل می‌کند، در حالی‌که قوس قطعه بزرگتری از کونفورماسیون نامنظم متصل کننده می‌باشد. ممکن است ترکیبی از موتیف‌ها یا سازمان‌های پیچیده‌تر ساختمان‌دوم، یک **فولد**[3] را به‌وجود آورند. یک فولد آرایشی از عناصر ساختمانی دوم یک **دومن**[4] می‌باشد. یک دومن ساختمانی یک واحد ساختمانی کروی متراکم است که در داخل پلی‌پپتیدی بـا یک هسته آبگریز و سطح آبـدوست به‌وجود می‌آید و معمولاً مستقل از واحدهای ساختمانی دیگر موجود در داخل زنجیر پلی‌پپتیدی تا می‌شود.

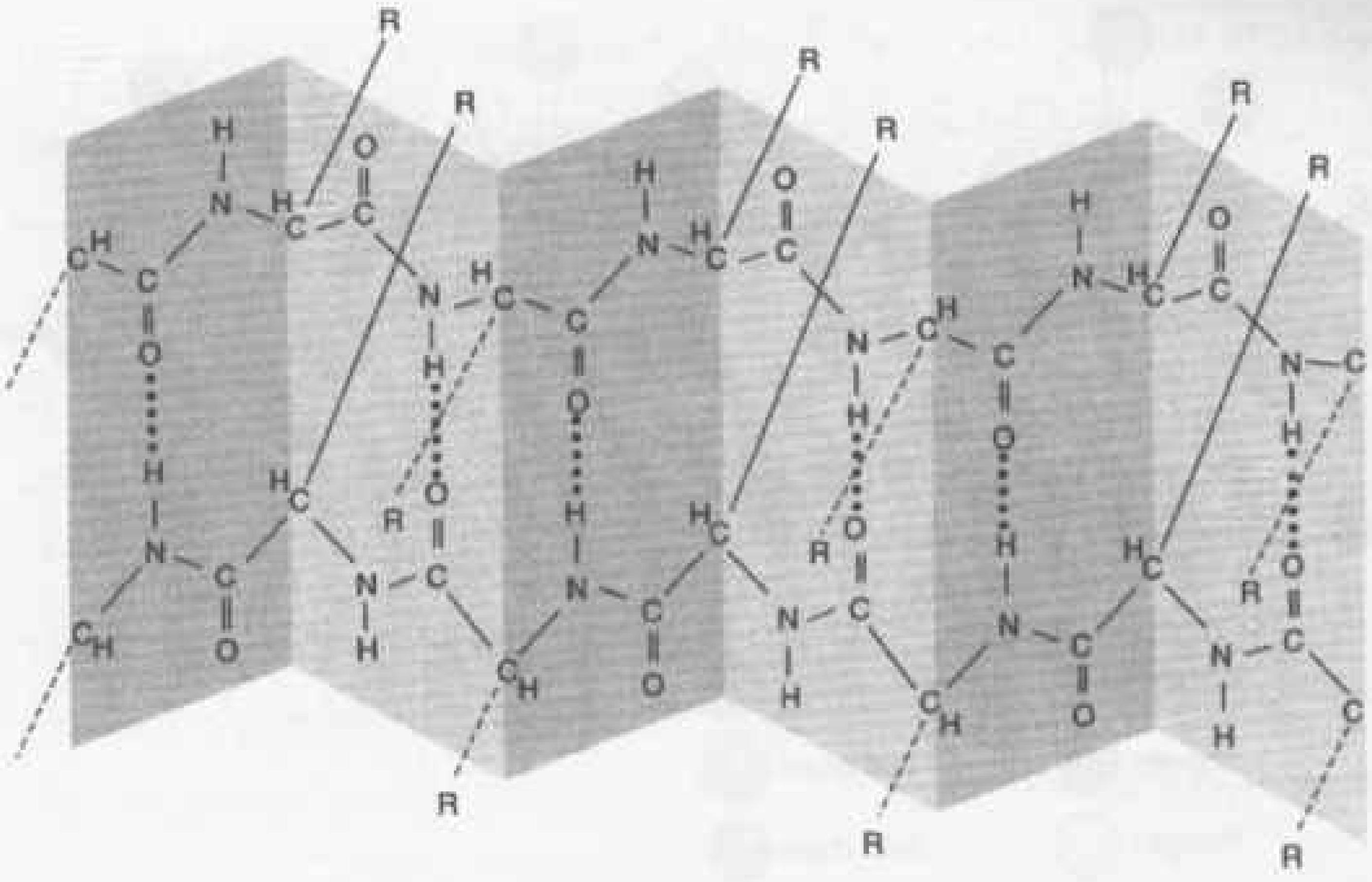
1. Pleated sheet 2. Structural motifs 3. Fold 4. Domain



شکل ۲۷-۳   دو زنجیر پلی‌پپتیدی در یک کونفورماسیون صفحه – β. زنجیرهای پلی‌پپتیدی ممکن است به هر کدام از لبه‌های دو رشته نشان‌داده‌شده اتصال یافته تا یک ساختمان امتدادیافته‌تر تولید شود.



شکل ۲۸-۳   مثال صفحه – β موازی ناهمسو (ریشه‌های ۹۸-۹۳ [بالا]، ۳۳-۲۸ [وسط]، و ۲۱-۱۶ [پایین] سوپراکسید دیس‌موتاز حاوی Cu و Zn). خطوط خط‌چین اشاره به پیوندهای هیدروژنی بین اتم‌های اکسیژن کربونیل (قرمز) و اتم‌های نیتروژن پپتیدی (خاکستری) دارند؛ پیکان‌ها جهت پلی‌پپتید از انتهای آمینو به انتهای کربوکسیل را نشان می‌دهند. در صفحه – β موازی ناهمسو مشخص، جفت‌های مربوط به پیوندهای هیدروژنی نزدیک به یکدیگر به تناوب با جفت‌های مربوط پیوند هیدروژنی دارای فاصله زیاد تکرار می‌شوند.



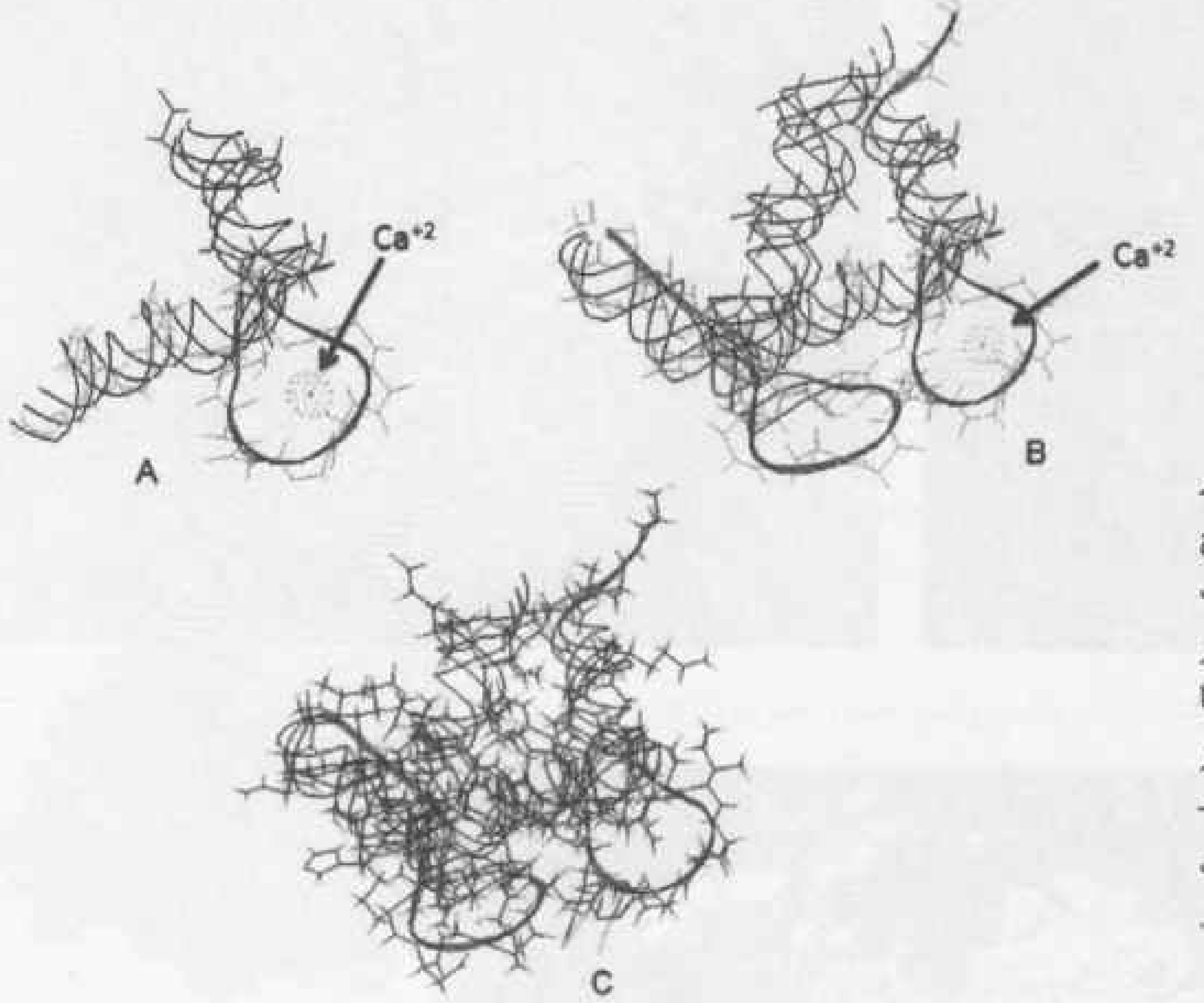
شکل ۲۹-۳ ساختمان صفحه - β بین دو زنجیر پلی‌پپتیدی که صفحات مربوط به پیوندهایی پپتیدی متصل را نشان می‌دهند. زنجیرهای پلی‌پپتیدی ممکن است به بالا و پایین اضافه شده تا یک ساختمان وسیع‌تر حاصل شود. گروه‌های زنجیر جانبی در طول یک زنجیر جانبی به تناوب در موقعیت‌های بالا و پایین صفحه وجود دارند.

دومن کالمودولین می‌تواند مثال خوبی برای تعریف واژه‌های موتیف ساختمانی، فولد و دومن باشد (شکل ۳۰-۳). کالمودولین به پروتئین‌های هدف اتصال یافته و به‌عنوان حسگر یون‌های کلسیم موجود در سلول عمل می‌کند. با افزایش میزان کلسیم، این یون سبب فعال‌سازی کالمودولین در جهت ارسال پیام به پروتئین هدف متصل به خود می‌شود. پروتئین‌های هدف کالمودولین در پیام‌رسانی سلولی، انقباض عضلانی، باروری، متابولیسم، مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده، حافظه بلند و کوتاه مدت، رشد عصبی، پاسخ ایمنی، و تقسیم سلولی نقش دارد. یون کلسیم به کالمودولین در داخل قوس یک موتیف مارپیچ - پیچ - مارپیچ به‌نام دست EF[1] اتصال می‌یابد (شکل ‎a‎۳۰-۳؛ شکل ۵۷-۱۲را نیز ببینید). نام این موتیف از مارپیچ‌های E و F (مارپیچ‌های ۵ و ۶ انتهای آمینو) در پروتئین عضلانی پاروالبومین[2] گرفته است که برای اولین بار این موتیف اتصالی کلسیم در آن دیده شد. موتیف دست EF انتشار وسیعی در پروتئین‌های اتصالی کلسیم دارد و در بیش از ۷۰ پروتئین مختلف با ساختمان‌های تعیین‌شده در بانک اطلاعات پروتئین، وجود دارد. فولد دومن کالمودولین متشکل از دو موتیف دست EF است که از طریق یک قطعه مارپیچی α به یکدیگر اتصال دارند (شکل ‎b‎۳۰-۳). با اضافه‌شدن گروه‌های زنجیر جانبی به ساختمان دوم در طول زنجیر پلی‌پپتیدی، ساختمان سوم کامل دومن حاصل می‌شود (شکل ‎c‎۳۰-۳).

ساختمان سوم

ساختمان سوم یک پلی‌پپتید اشاره به موقعیت هر کدام از اتم‌ها در فضا دارد. این شامل ارتباط هندسی بین قطعات دور ساختمان‌های اول و دوم به همراه ارتباط موقعیتی زنجیرهای جانبی نسبت به یکدیگر می‌باشد. ساختمان سوم تریپسین در شکل ۳۱-۳

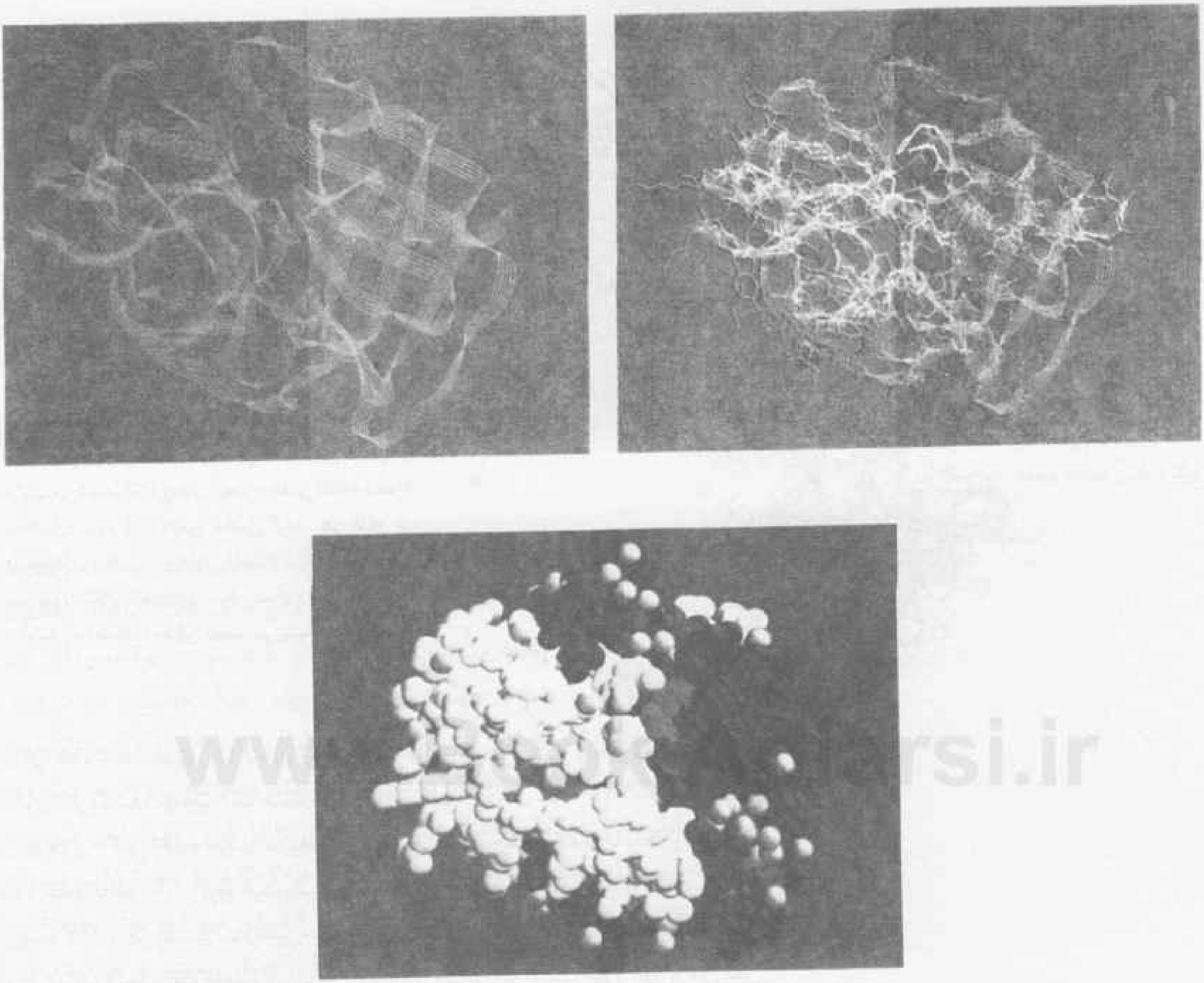
1. EF hand 2. Parvalbumin



شکل ۳۰-۳ ساختمان‌های موتیف و فولد موجود در داخل دومن کالمودولین. (a) موتیف ماربیچ - پیچ - ماربیچ دست EF همراه با Ca^{+2} اتصال یافته. (b) دو موتیف دست EF- در فولد دومن انتهای کربوکسیل کالمودولین با یکدیگر ترکیب می‌شوند. (C) گروه‌های زنجیر - جانبی اضافه شده تا ساختمان سوم این دومن حاصل گردد. هر کدام از ماربیچ‌های α-، رنگ متفاوتی دارند که در آنها زنجیر پلی‌پپتیدی به‌شکل یک روبان مشکی نشان داده شده است تا نمایش ساختمان دوم این زنجیر پلی‌پپتیدی بهتر گردد.

نشان داده شده است. ساختمان روبانی (a) کونفورماسیون تک زنجیر پلی‌پپتیدی و الگوی کلی تاشدن زنجیر (ساختمان تاشده) را نشان می‌دهد. شکل b۳۱-۳ به موقعیت زنجیرهای جانبی اشاره دارد. زنجیرهای جانبی کاتالیتیک جایگاه فعال با رنگ زرد نشان داده شده‌اند که شامل گروه هیدروکسی‌متیل سرین (ریشه ۱۷۷)، ایمیدازول هیستیدین (ریشه ۴۰)، و کربوکسیلات زنجیر جانبی آسپارتات (ریشه ۸۵) می‌باشد. با وجود این که آنها در ساختمان اول فاصله زیادی از یکدیگر دارند، ساختمان سوم آنها را در کنار یکدیگر قرار می‌دهد تا جایگاه کاتالیتیک را به‌وجود آورند. در شکل c۳۱-۳، یک مدل فضاپرکن، اتم‌های C، N، و O را به‌صورت کره‌هایی با شعاعی متناسب با شعاع واندروالس آنها نشان می‌دهد. این ساختمان براساس قواعد عمومی پروتئین‌های کروی، شکل فضایی خود را اتخاذ می‌کند (قسمت ۳-۳). زنجیرهای جانبی آبگریز عموماً در داخل و به دور از فصل مشترک با آب قرار می‌گیرند. زنجیرهای جانبی یونیزه‌شده در سمت خارج قرار می‌گیرند و در این محل توسط آب حلال تثبیت می‌شوند. در داخل ساختمان پروتئین (نشان داده نشده است)، ملکول‌های آبی مدفون می‌شوند که اغلب تعاملات پایدارکننده اختصاصی را نشان می‌دهند. تعداد زیادی ملکول آب یک قشر حلالیت را در خارج پروتئین به‌وجود می‌آورند.

یک پلی‌پپتید بلند اغلب به صورت چندین ناحیه متراکم نیمه-مستقل یا دومن تا می‌شود که هر کدام یک هندسه متراکم مشخص با یک هسته آبگریز و سطح قطبی دارد.



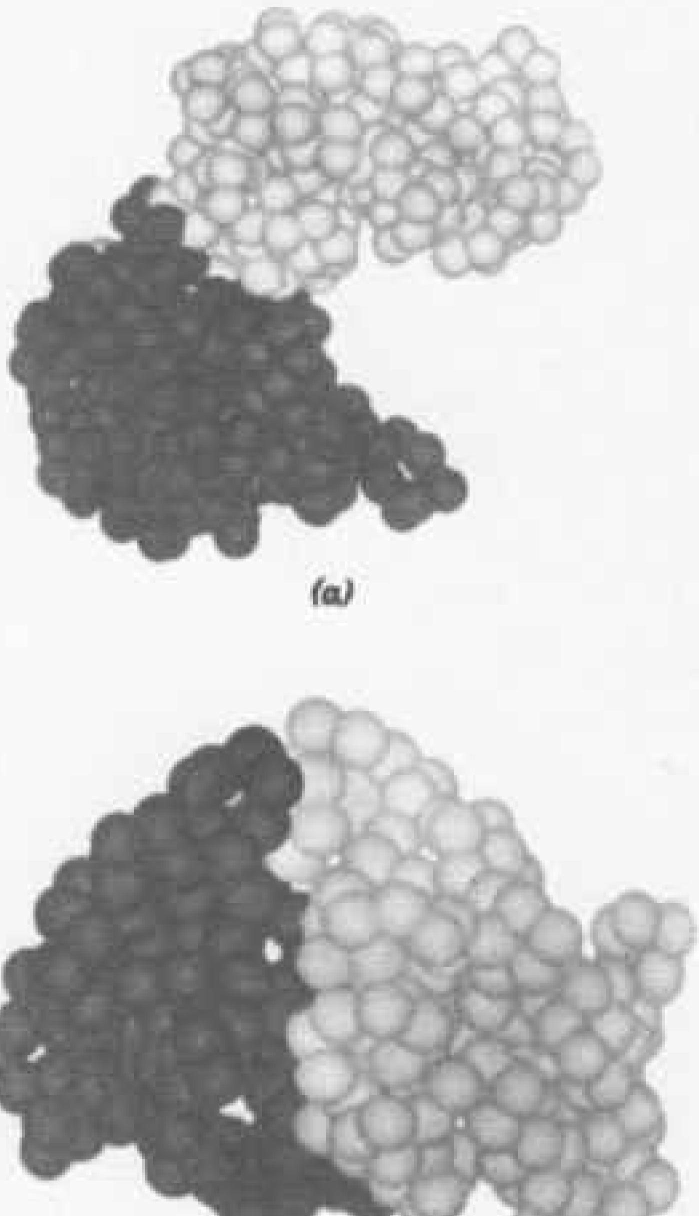
شکل ۳۱-۳ **ساختمان سوم تریپسین.** (a) ساختمـان روبانی کونفورماسیون زنجیر پلی‌پپتیدی را نشان می‌دهد. (b) این ساختمان زنجیرهای جانبی شامل ریشه‌های جایگاه فعال (به رنگ زرد) با حدود زنجیر پلی‌پپتیدی (روبانی) قرار گرفته بر روی آن را نشان می‌دهد. (c) ساختمان فضا-پرکنی که در آن هر اتم به اندازه شعاع واندروالس خود ترسیم شده است. در (c) اتم‌های هیدروژن نشان داده نشده‌اند. دومن‌های مختلف با رنگ آبی تیره و سفید نشان داده شده‌اند. ریشه‌های جایگاه فعال به رنگ زرد و پیوندهای دی‌سولفیدی درون‌زنجیری سیستین به رنگ قرمز هستند. کره‌های آبی روشن اشاره به ملکول‌های آب همراه با پروتئین‌ها دارند. این ساختمان تراکم بسته‌بندی در داخل پروتئین را نشان می‌دهد.

به‌طور شاخص این نواحی شامل ۱۵۰-۱۰۰ اسید آمینه هستند. دومن‌های موجود در یک **پروتئین چنددومنی** ممکن است از طریق یک قطعه فاقد یک ساختمان دوم منظم به یکدیگر اتصال یابند. در حالت دیگر، این نواحی تاشده متراکم کروی ممکن است توسط یک شکاف یا ناحیه‌ای با تراکم کمتر ساختمان سوم جدا شوند (شکل ۳۲-۳). تریپسین دو دومن دارد که در میان آنها یک شکاف حاوی جایگاه کاتالیتیک اتصال به سوبسترا یافت می‌شود. یک جایگاه فعال موجود در فصل مشترک بین‌دومنی، یکی از مشخصات

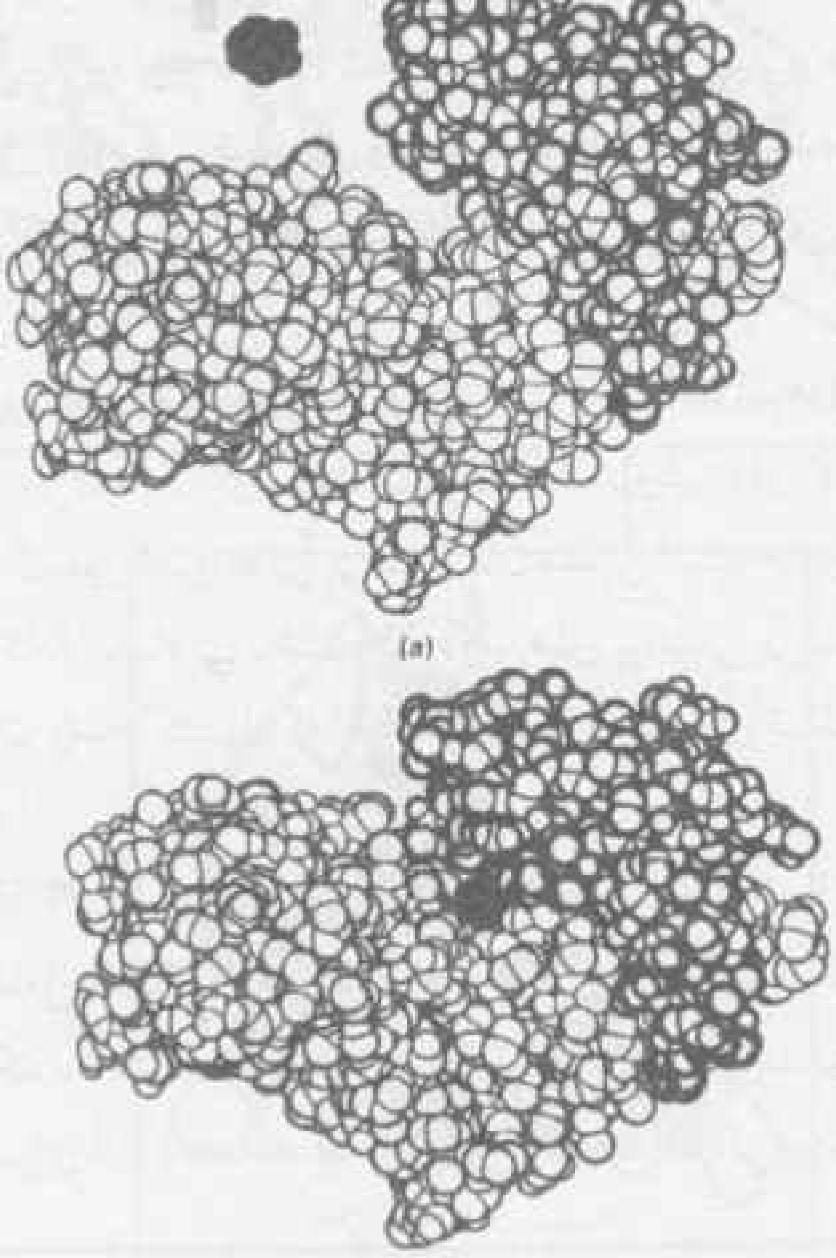
تعداد زیادی از آنزیم‌ها است. دومن‌های مختلف موجود در داخل یک پروتئین می‌توانند نسبت به یکدیگر حرکت کنند. هگزوکیناز (شکل ۳۳-۳) که فسفریلاسیون گلوکز توسط آدنوزین تری‌فسفات (ATP) را کاتالیز می‌کند (ص ۸۰۸)، یک جایگاه اتصال به گلوکز در ناحیه‌ای بین دو دومن دارد. وقتی گلوکز به این جایگاه فعال اتصال یافت، دومن‌های اطراف حرکت کرده (قسمت ۸-۳) تـا سوبسترا برای فسفریلاسیون بدام بی‌افتد (شکل ۳۳-۳). در آنزیم‌هایی با بیش از یک سوبسترا یا جایگاه افکتوری آلوستریک (ص ۵۶۲)، جایگـاه‌های مختلف ممکن است در داخل دومـن‌های مختلف قـرار داده شونـد. در پروتئین‌های چندکاره، هر دومن ممکن است یک وظیفه متفاوت را برعهده داشته باشد.

ساختمان چهارم

ساختمان چهارم اشاره به آرایش زنجیرهای پلی‌پپتیدی در یک پروتئین چند زنجیری دارد. زیرواحدهای موجود در یک ساختمان چهارم به‌طور غیرکووالان به یکدیگر می‌پیوندند. α-کیموتریپسین سه پلی‌پپتید دارد که از طریق پیوندهای دی‌سولفیدی درون زنجیری به‌طور کووالان به یکدیگر متصل شده تـا یک واحد کووالان تکی را به‌وجود آورند و به همین دلیل α-کیموتریپسین فاقد ساختمان چهارم است. میوگلوبین متشکل از یک زنجیر



شکل ۳۲-۳   دومن‌های گلبولی موجود در داخل پروتئین‌ها. (a) فسفوگلیسرات کیناز دو دومن دارد. (b) الاستـاز دو دومن بـا ارتبـاط محکم دارد که توسط یک شکاف از یکدیگر جدا شده‌اند. هر کدام از کره‌های موجود در این نمایش فضا-پرکن اشاره به موقعیت کربن α- اسید آمینه موجود در داخل این ساختمان پروتئین دارد.



شکل ۳۳-۳   تصاویری از (a) شکل بدون لیگاند هگزوکیناز و گلوکز آزاد و (b) کونفورماسیون هگزوکیناز همراه با گلوکز اتصال‌یافته. در این نمایش فضا-پرکن، هر حلقه اشاره به شعاع واندروالس یک اتم در این ساختمان دارد. گلوکز تیره است و هر دومن سایه متفاوتی دارد.

پلی‌پپتیدی است و به همین دلیل ساختمان چهارم ندارد. هرچند، هموگلوبین **A** دارای چهار زیرواحد پلی‌پپتیدی ($\alpha_2\beta_2$) است که به شکل غیرکووالان در کنار یکدیگر قرار گرفته و کونفورماسیون اختصاصی را به‌وجود می‌آورند که برای فعالیت آن لازم می‌باشد (ص ۴۹۰). لذا هموگلوبین ساختمان چهارم دارد. آسپارتات کرباميل ترانسفراز باکتریایی (ص ۱۰۹۵) یک ساختمان چهارم متشکل از ۱۲ زیرواحد پروتئینی دارد. پروتئین پوششی پولیوویروس متشکل از ۶۰ زیرواحد پلی‌پپتیدی و پروتئین ویروس موزائیک تنباکو حاوی ۲۱۲۰ زیرواحد است که به‌طور غیرکووالان به یکدیگر پیوسته‌اند.

پروتئین‌های بی‌ساختمان

پروتئین‌هایی که قبلاً شرح داده شدند، فولدها و ساختمان‌های سوم مشخصی دارند که در آنها موقعیت فضایی تقریبی اتم‌های موجود در ساختمان‌های تاشده شناخته‌شده می‌باشند. برعکس، پروتئین‌هایی وجود دارند که فاقد یک ساختمان تاشده پایدار هستند. این موضوع تعجب‌آور نیست، زیرا پروتئین‌های تاشده معمولاً تنها ۲۱-۴۲kJ/mol (۵-۱۰kcal/mol) پایدارتر از کونفورماسیون دناتوره خود هستند (قسمت ۷-۳). لذا می‌توان انتظار داشت که در درجه حرارت‌های فیزیولوژیک پروتئین‌هایی وجود دارند که فاقد یک کونفورماسیون تاشده پایدار هستند. پروتئین‌های دارای یک کونفورماسیون غیرتا-شده را **پروتئین‌های ذاتاً بی‌ساختمان**[1] **(IUPs)** گویند. سایر پروتئین‌ها ممکن است نواحی بی‌ساختمان یا دومن‌های حاوی **کونفورماسیون‌های نسبتاً تانشده**[2] **(PUFs)** داشته باشند.

IUPs و پروتئین‌های دارای **PUFs** شامل پروتئین‌های داربستی، هورمون‌ها، دومن‌های فعال‌سازی فاکتور رونویسی، کینازهای وابسته به سیکلین و مهارکننده‌های آنها، پروتئین‌های موجود در تبدیل پیام سلولی، و قطعات انتهای آمینوی پروتئین‌های هیستونی موجود در نوکلئوزوم‌ها، می‌باشند.

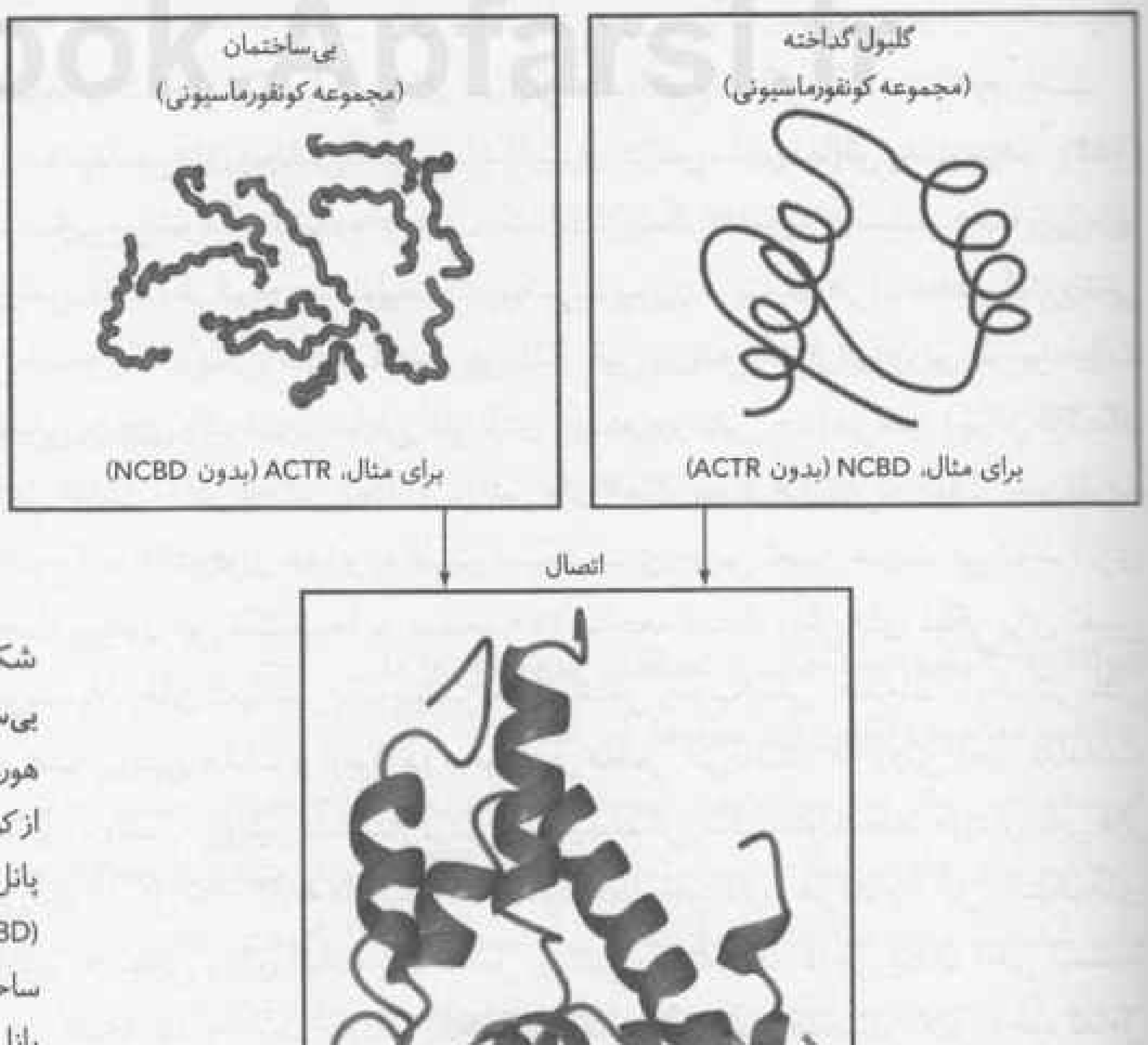
کونفورماسیون‌های تانشده شدیداً پویا هستند که در آنها اتم‌ها تحرک در جایگزینی و چرخش را نشان می‌دهند (برای بحث پیرامون تحرک پروتئین‌های تاشده، قسمت ۸-۳ را ببینید). هرچند، کونفورماسیون‌های بی‌ساختمان ممکن است حاوی نواحی از ساختمان دوم منظم و نه کاملاً تصادفی باشند. این دومن‌های پروتئینی بی‌ساختمان ممکن است مشابه ترکیبات واسط گلبول گداخته موجود در مسیرهای تاشدن پروتئین باشند (قسمت ۵-۳).

IUPs و **PUFs** اغلب از طریق اتصال به سایر پروتئین‌ها یا **DNA** و **RNA** عمل می‌کنند. این تعامل اتصالی سبب القاء ساختمانی در پلی‌پپتید تاشده می‌شود (شکل ۳۴-۳). القاء یک ساختمان مشخص در **IUP** یا **PUF** یک فرایند آنتروپیک منفی می‌باشد که نیاز به یک انرژی آزاد نامساعد دارد. بنابراین، قدرت اتصالی پروتئین‌های بی‌ساختمان

1. Intinsically unstructured proteins 2. Partially unfolded coformations

در اتصال به پروتئین‌های اتصالی خود، عموماً ضعیف‌تر از اتصال یک ملکول به یک ساختمان از قبل تشکیل‌شده می‌باشد که نیازی به به‌کارگیری قسمتی از انرژی اتصالی مساعد آن برای کشاندن یک تغییر کونفورماسیونی ندارد که خود از نظر آنتروپی نامساعد است. این خصوصیت اتصال ضعیف اغلب یک مزیت است، زیرا برای بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی نیاز به تعاملات ضعیف و گذرا می‌باشد. به‌علاوه، دومن‌های بی‌ساختمان نوعی بی‌نظمی را در اتصال به پارتنرهای خود نشان می‌دهند، زیرا فاقد یک ساختمان از قبل تشکیل‌شده هستند که به آنها خاصیت انعطاف‌پذیری را برای ایجاد سطوح اتصالی مکمل نسبت به پارتنرهای اتصالی مختلف می‌دهد. بر همین اساس **p21** به‌عنوان مهارکننده کیناز وابسته به سیکلین، در فازهای مختلفی از چرخه سلولی وجود دارد. پروتئین‌های داربستی تعداد زیادی پروتئین را به‌صورت یک کمپلکس وظیفه‌دار جمع می‌کنند. انعطاف‌پذیری این پروتئین‌ها امکان اتصال پارتنرهای متعدد در داخل این کمپلکس را فراهم ساخته و امکان ایجاد تغییراتی در اعضاء پروتئینی جهت رفع نیازهای فیزیولوژیک را به‌وجود می‌آورد.

نواحی بدون ساختمان پروتئین‌ها را می‌توان از توالی اسید آمینه‌ای پلی‌پپتید آنها شناسایی نمود. نواحی نامنظم غنی از اسیدهای آمینه قطبی و باردار (گلوتامات، لیزین، و



شکل ۳-۳۴ القاء ساختمان در دومن‌های بی‌ساختمان به‌دنبال اتصال. دومن تعامل مربوط به فعالگر هورمون تیروئید وگیرنده‌های رتینوئید (ACTR) مجموعه‌ای از کونفورماسیون‌های بی‌ساختمان (قهوه‌ای مایل به قرمز، پانل بالا چپ) است و دومن کمک فعال‌گر گیرنده-هسته (NCBD) یک کونفورماسیون گلبول گداخته همراه با عناصر ساختمان دوم منظم و یک ساختمان سوم نامنظم (سبز، پانل راست بالا) دارد. به دنبال اتصال، یک ساختمان دوم و سوم پایدار در هر دو پروتئین (پانل پایین) القاء می‌شود.

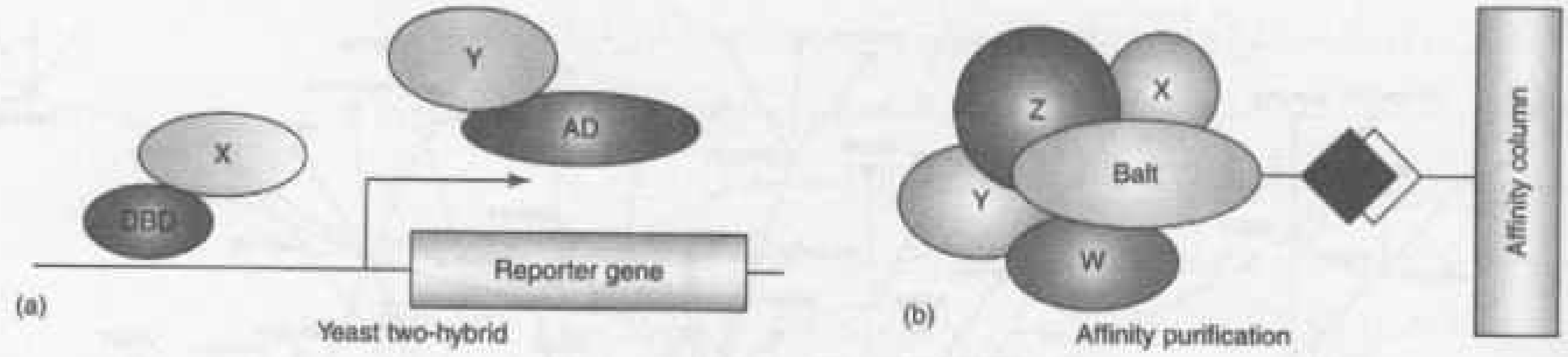
گلوتامین) و اسید آمینه پرولین هستند و فاقد اسیدهای آمینه آروماتیک و آلکیلی می‌باشند. الگوریتم‌هایی برای جستجوی توالی‌ها و شناسایی نواحی بی‌ساختمان پتانسیل زنجیرهای پلی‌پپتیدی ابداع شده‌اند. احتباس پروتئین‌های بی‌ساختمان و PUFها در داخل پروتئین‌های اختصاصی در طی تکامل، اهمیت این نواحی را در فرایندهای بیولوژیکی مهم نشان می‌دهد.

کمپلکس‌ها، شبکه‌ها و اینتراکتوم‌های پروتئینی

ملکول‌های پروتئین موجود در محیط‌های سلولی اساساً به شکل کمپلکس‌های پروتئینی حاوی چندین زیرواحد پروتئینی وجود دارند. این کمپلکس‌ها ضرورتاً در اکثر فرایندهای سلولی شامل پیام‌رسانی سلولی، رونویسی ژنی، اسپلایسینگ و ترجمه RNA، آپوپتوز و متابولیسم سلولی فعالیت دارند. این کمپلکس‌ها معمولاً ۵ تا ۱۰ پروتئین دارند، ولی ممکن است تا ۳۰-۲۰ پروتئین مختلف داشته باشند. این کمپلکس‌ها از طریق پروتئین‌های موجود در دو یا چند کمپلکس پروتئینی مختلف با یکدیگر در ارتباط هستند که می‌توانند بین کمپلکس‌ها حرکت نموده تا با اتصال این کمپلکس‌ها به یکدیگر تولید **شبکه**[1] کنند. کمپلکسی که با بیش از سه کمپلکس دیگر ارتباط برقرار می‌کند، به‌عنوان یک **هاب**[2] در شبکه است، و هدف مهمی برای درمان‌های دارویی یک بیماری می‌باشد. یک شبکه وظیفه‌دار متشکل از کمپلکس‌های پروتئینی مرتبط با یکدیگر، یک **اینتراکتوم**[3] است.

کمپلکس‌های پروتئینی سلولی با بکارگیری **خالص‌سازی تمایلی پشت‌سرهم**[4] **(TAP)** شناسایی می‌شوند که مستلزم قراردادن یک ژن گزارشگر به‌صورت پشت‌سرهم با ژنی برای پروتئین مورد نظر در جهت تولید یک پروتئین کایمری است که در آن محصول پروتئینی هدف به یک پروتئین دم‌دار متصل می‌باشد. این پروتئین دم‌دار از طریق الوشن لیزات سلولی بر روی یک ستون تمایلی آنتی‌بادی ضددم پروتئینی[5] جدا می‌شود (شکل ۳۵-۳). رزین تمایلی به این پروتئین دم‌دار و پروتئین‌های همراه اتصال می‌یابد که خود از ستون الوت (خارج)، با الکتروفورز جدا و به طریق اسپکترومتری جرمی تعیین هویت می‌شوند (برای بحث پیرامون این تکنیک‌ها به صفحه ۱۷۰ مراجعه کنید). روش‌های دیگر برای تعیین هویت پارتنرهای کمپلکس یک پروتئین هدف شامل **رسوب‌ایمنی-همزمان**[6] با یک آنتی‌بادی بر علیه پروتئین هدف و **آزمون دو-هیبریدی مخمر**[7] می‌باشند؛ در روش اخیر تعاملات دوتایی پروتئین-پروتئین پستانداران در یک سیستم گزارشگر سلول مخمر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (شکل ۳۵-۳). به دلیل این که معمولاً خطا وجود دارد، هر کدام از این تکنیک‌های آزمون به تنهایی برای اثبات یک تعامل پروتئین-پروتئین در داخل بدن کافی نیستند. وقتی نتیجه بیش از یک مورد این تکنیک‌ها مثبت است، با اطمینان بالایی وجود تعامل

1. Network 2. Hub 3. Interacome 4. Tandem affinity purification
5. Antitag protein antibody affinity column 6. Co-immunoprecipitation 7. Yeast two-hybride assay



شکل ۳۵-۳ دو روش برای تعیین تعاملات پروتئین-پروتئین. (a) تکنیک دو-هیبریدی مخمر تعاملات پروتئین-پروتئین دوتایی را در یک سیستم بیان مخمری تعیین می‌کند. یک پروتئین فاکتور رونویسی که به توالی تنظیمی فرادست یک ژن گزارشگر مخمر نظیر Gal4 اتصال می‌یابد، شامل یک دومن اتصال به (DBD) و یک دومن فعال‌سازی (AD) است که نیاز به بیان فعال ژن گزارشگر دارد. نواحی کدکننده دومن‌های DBD و AD جدا و به ژن‌های مورد نظر پستانداران (X و Y) اتصال داده شده و در سلول‌های مخمر بیـان می‌شوند تـا پروتئین‌های کایمری DBD-X و Y-AD بیان گردند. در صورتی‌که پروتئین Y به پروتئین X اتصال یابد، دومن‌های DBD و AD در کنار یکدیگر قرار داده شده و سبب تنظیم افزایشی بیان ژن گزارشگر می‌شوند. ژن مشهور Gal4 تولید آنزیم β-گالاکتوزیداز می‌کند که در پلیت‌های حاوی سوبسترای مناسب، یک رنگ آبی به سلول‌ها می‌دهد. (b) در تکنیک تخلیص تمایلی پشت‌سرهم (TAP) یک پروتئین دنباله (مربع ارغوانی) به پروتئین مورد نظر (پروتئین طعمه، نارنجی) اتصال داده می‌شود و این پروتئین کایمری در سلول مورد نظر بیان می‌گردد. لیزات سلولی از میان یک رزین حاوی آنتی‌بادی ضد پروتئین دنباله دارای کمپلکس پروتئینی طعمه (پروتئین‌های W-Z) عبور داده می‌شود. پروتئین‌های اتصال‌یافته از این ستون تمایلی الوت می‌شوند و به‌طریق اسپکترومتری جرمی تعیین می‌گردند.

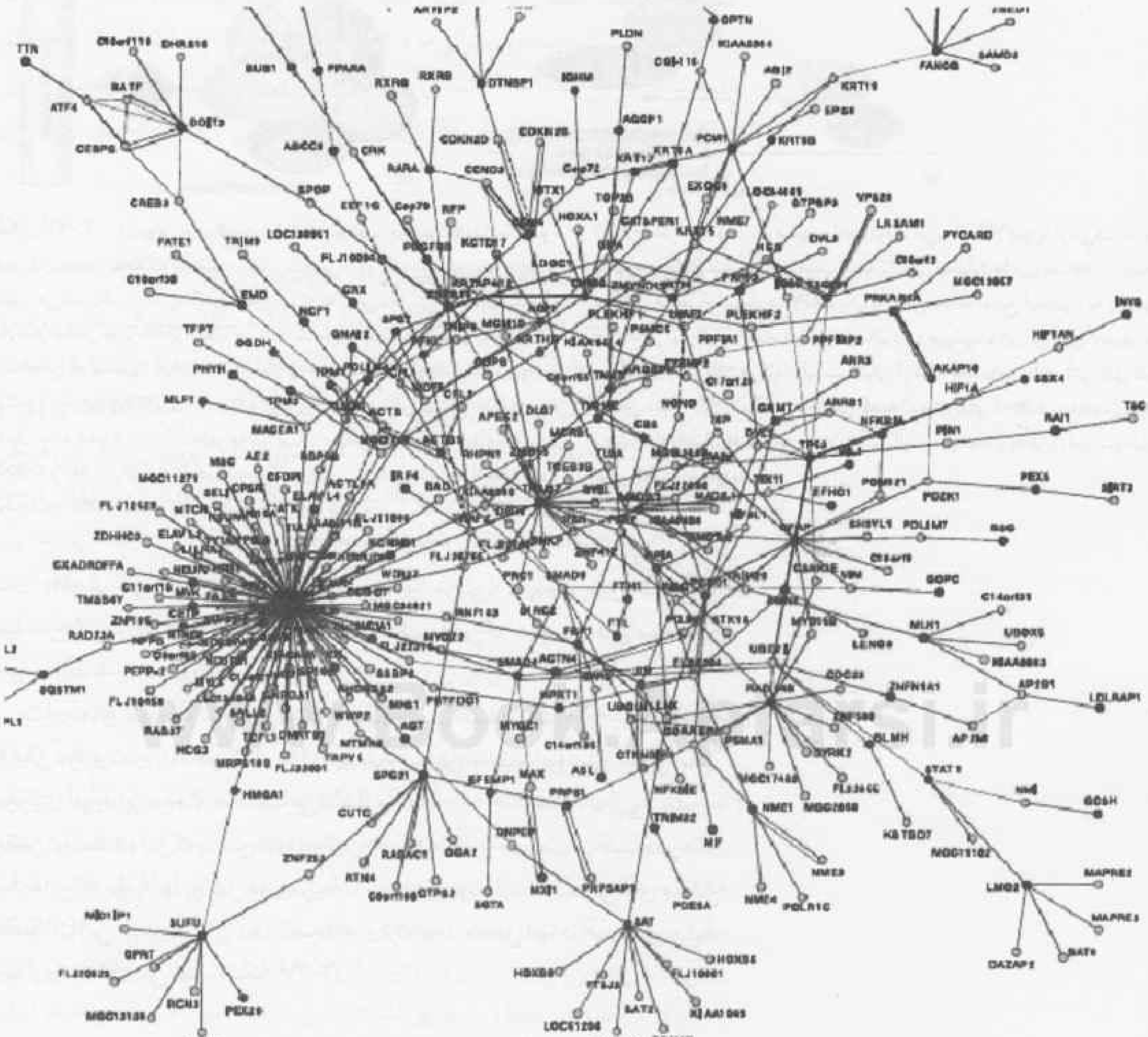
نشان داده می‌شود. این تکنیک‌ها کمپلکس‌های موقتی، کمپلکس‌های غشایی یا کمپلکس‌هایی از وضعیت‌های فیزیولوژیک یا فنوتیپ‌هایی که در سلول‌های مورد آنالیز وجود ندارند را جدا نمی‌کنند.

بـرآوردهای تئوریک نشان می‌دهند که یک سلـول انسانی حدود ۳۰۰۰ کمپلکس پروتئینی مرکزی دارد که هـر کدام دارای چندین ایـزوفرم (اعضاء پروتئینی قـابل تبادل غیرمرکزی[1] تولید ایزوفرم‌های مختلف می‌کنند)، و حدود ۶۵۰,۰۰۰ تعامل دوتایی پروتئین-پروتئین تولیدکننده این کمپلکس‌های پروتئینی هستند. تعیین خصوصیات کمپلکس‌ها و شبکه‌هایی که برای آنها پروتئین‌های مرتبط با بیماری وجود دارند، وابستگی‌های متقابل محصولات ژنی متعدد مؤثر بر یک ناهنجاری و ارتباطات متقابل آنها در مسیرهای مرتبط با بیماری را نشان می‌دهند (شکل ۳۶-۳).

بیوانفورماتیک ساختمان و عملکرد پروتئین را با محصولات پروتئینی ژن مرتبط می‌سازد

طی دهه اخیر توالی‌های نوکلئوتیدی ژنوم‌های مربوط به گونه‌های حیوانی متعدد به‌دست آمده‌اند و توالی‌های مربوط به رونوشت‌های RNA و توالی‌های پلی‌پپتیدی از DNA ژنومی تولید شده‌اند. میزان اطلاعات فوق‌العاده زیاد است و در پایگاه‌های کامپیوتری ذخیره شده‌اند که از طریق اینترنت براحتی قابل دسترسی می‌باشند. تعداد توالی‌های پلی‌پپتیدی موجود در پایگاه UniPort Knowledge از ۲۰۰۸ بیش از ۶/۴ میلیون می‌باشد که ۷۵,۰۰۰

1. Noncore exchangable



شکل ۳۶-۳ نقشه مقدماتی اینتراکتوم مرتبط با بیماری برای زیرمجموعه‌ای از ۷۲۰۰ پروتئین انسانی. تعاملات دوتایی دو-هیبریدی مخمر در میان زیر مجموعه‌ای از ۷۲۰۰ محصول ژنی تعیین شد. اینتراکتومی که نشان داده شده است، مربوط به تعاملات اتصالی پروتئین‌های شناخته‌شده مرتبط با بیماری هستند که در پایگاه اطلاعاتی OMIM مشخص شده‌اند. گره‌های سبز محصولات ژنی در پایگاه اطلاعاتی OMIM هستند، و گره‌های زرد اشاره به محصولات ژنی بدون تخصیص OMIM رایج دارند. لبه‌های قرمز تعاملات دوتایی را نشان می‌دهند که توسط Rual و همکارانش شناسایی شده‌اند، و لبه‌های آبی تیره توسط مؤلف از نوشتجات دریافت شده‌اند. لبه‌های خط‌دار تعاملات از طریق پروتئین سوم را نشان می‌دهند.

آن مربوط به انسان است. بانک اطلاعات پروتئین حاوی ۴۷,۰۰۰ ساختمان سه-بُعدی مربوط به پروتئین‌های تاشده است که با انکسار اشعه-X، رزونانس مغناطیسی هسته و میکروسکوپی الکترونی به‌دست آمده‌اند. **بیوانفورماتیک** یک عرصه پژوهشی کامپیوتر-محور

است که بر روی یکپارچگی و آنالیز داده‌های بیولوژیکی پیچیده با الگوریتم‌های کامپیوتری متمرکز می‌باشد. تأکید اصلی بیوانفورماتیک در شناسایی الگوهایی در داخل توالی‌های اسید نوکلئیکی یا اسید آمینه‌ای بوده است که به‌عنوان **امضاءهای**[1] مربوط به خصوصیات یا موتیف‌های ساختمانی و مربوط به خانواده یا کلاس پروتئینی که محصول ژنی به آنها تعلق دارد، می‌باشند. از این الگوریتم‌های پژوهش-هُمولوژی برای تعیین هویت و طبقه‌بندی محصولات ژنی براساس شباهت توالی استفاده می‌شود، و وقتی ساختمان مشخص است، پژوهش هُمولوژی ممکن است براساس شباهت ساختمانی باشد. برای امتیازبندی شباهت توالی از معیارهایی براساس هویت مطلق ریشه‌ها در موقعیت‌های معادل تا شباهت از نظر قطبیت، آبگریزی و اندازه استفاده می‌شود. این الگوریتم‌ها امکان افزودن یا حذف قطعاتی از زنجیر یا ساختمان پلی‌پپتیدی را فراهم می‌سازند تا حداکثر همپوشانی ممکن بین دو پروتئین حاصل شود.

دومن‌های پروتئینی براساس کلاس، فولد و خانواده طبقه‌بندی می‌شوند. **کلاس** توسط نوع غالب ساختمان دوم موجود در پروتئین تعیین می‌شود. برخی مثال‌ها شامل اساساً مارپیچ α[2] (همه α[3])، اساساً رشته β (همه β)، و مقادیر تقریباً برابر مارپیچ α و رشته β (متناوب[4] [α یا β] و غیرمتناوب[5] [$\alpha+\beta$]) می‌باشند. **فولد** توسط آرایش خاص عناصر ساختمان دوم موجود در داخل دومن تعیین می‌شود. **خانواده** توسط درجاتی از یکسانی توالی بین پروتئین‌ها تعیین می‌شود. پروتئین‌هایی که اعضایی از یک خانواده هستند، یک ارتباط تکاملی مشترک دارند و از یک ژن ابتدایی مشتق می‌شوند. پروتئین‌های یک خانواده دارای فولد و اغلب فعالیت‌های یکسان هستند.

چیزی که در پزشکی بالینی حائز اهمیت می‌باشد، یافتن جهش‌هایی در توالی اسید آمینه‌ای است که می‌تواند منجر به تغییرات قابل‌توجه در عملکرد شود. در سطح ملکولی، تغییراتی حتی در یک اسید آمینه می‌تواند مهم باشد. یک جهش اسید آمینه‌ای ممکن است سبب اختلال در کونفورماسیون بومی، انعطاف‌پذیری کونفورماسیونی؛ انرژتیک، یا تحرک ملکول؛ و انتخابی بودن آنزیم‌ها در برابر سوبستراها و مهارکننده‌ها شود. مثال‌های مربوطه شامل هموگلوبین‌ها می‌باشند که برای آنها فهرست وسیعی از جهش‌ها وجود دارد. برخی جهش‌های هموگلوبینی علائم بالینی مهمی، نظیر کم‌خونی سلول داسی (ارتباط بالینی ۲-۶ را ببینید) را تولید می‌کنند. برخی موقعیت‌ها در توالی اسید آمینه‌ای، واریانت‌هایی در میان جمعیت‌ها هستند. این موقعیت‌های توالی، وقتی همراه با تک تغییراتی در کدون بازی برای یک اسید آمینه هستند را **چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی**[6] **(SNPs)** گویند و می‌توانند منجر به شناخت تفاوت‌هایی در پاسخ به یک بیماری یا درمان دارویی در میان جمعیت‌های انسانی شوند.

---
1. Signatures
2. α-helix- Mainly
3. α- All
4. Alternating
5. Nonalternating
6. Single nucleotide polymorphisms

ساختمان‌های فولد همولوگوس اغلب از توالی‌های اسید آمینه‌ای غیرهولوگوس تولید می‌شوند

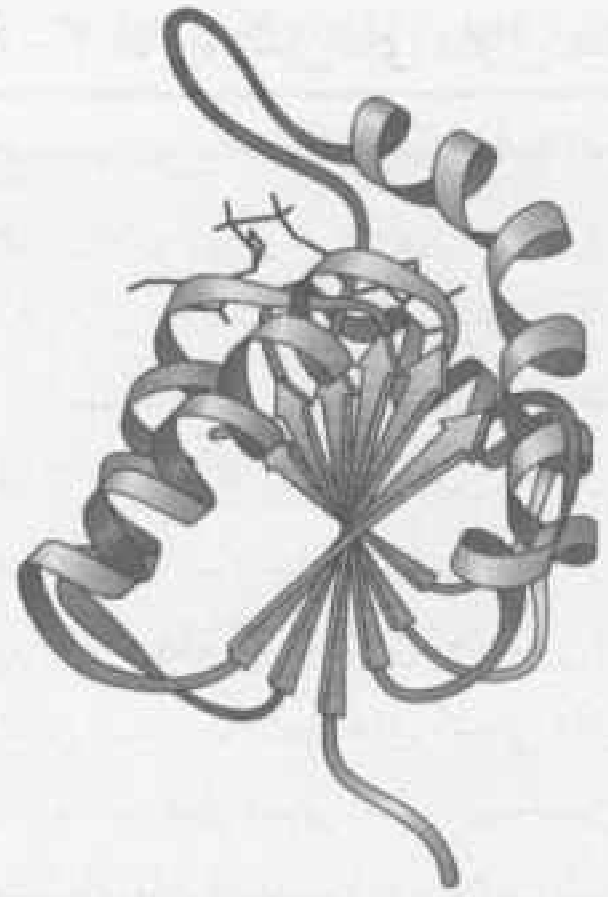
بـا وجود این که هر کونفورمـاسیون بومی بی‌همتـا است، مقایسه ساختمـان‌های سوم پروتئین‌های مختلف نشان می‌دهد که اغلب آرایش‌های مشابهی از موتیف‌های ساختمان دوم در ساختمان‌های تـاشده دومن‌ها وجود دارد. فولدهای دارای ساختمان مشابه از پروتئین‌هایی که از نظر عملکرد، توالی یا تکامل ارتباطی با یکدیگر ندارند را **سوپرفولد**[1] گویند. اینها به‌دلیل پایداری ترمودینامیکی آرایش‌های ساختمانی دوم خود یا دسترسی کینتیکی ایجاد می‌شوند.

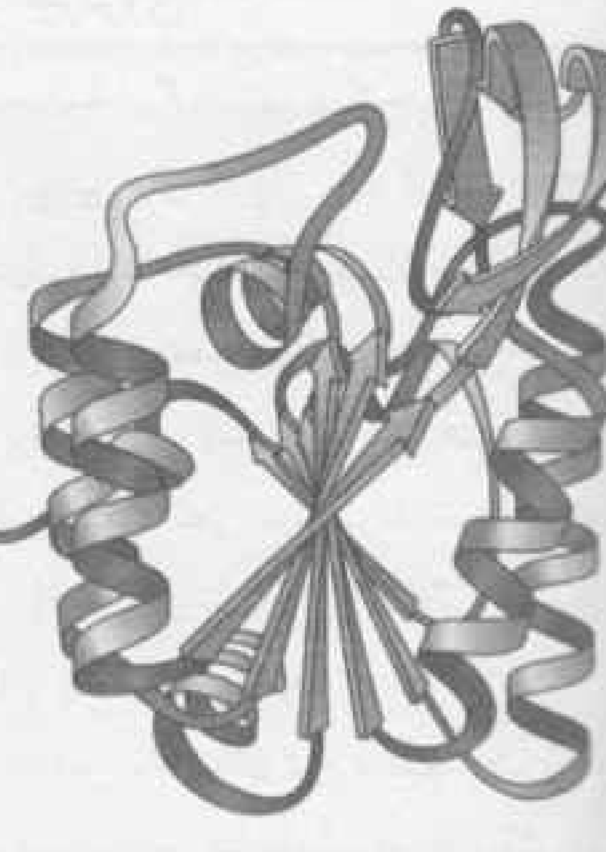
یک فولد یا دومن همه α معمول در لیزوزیم وجود دارد و به‌عنوان فولد گلوبینی مشخص می‌شود (شکل ۳۷-۳)، زیـرا بـرای اولین بـار در میـوگلوبین و زیرواحدهای هموگلوبین گزارش شد (ص.۴۸۳). این ساختمان‌های همه α دارای هفت یا هشت قطعه مارپیچ α هستند که از طریق قطعات کوچکتری به یکدیگر اتصال دارند که به مارپیچ‌ها این امکان را می‌دهند که بر روی خود تا شده و تولید یک شکل گلبولی مشخص کنند. از آنجایی‌که این فولد تـوسط پـروتئین‌هایی از خانواده‌های بـا هُمولوژی مختلف تـولیـد می‌شود، این فولد گلوبینی یک سوپـرفولد است. سوپـرفولد معمـول دیگر **ساختمان دومن α/β** در تریـوز فسفات ایـزومـراز (شکل ۳۸-۳) می‌بـاشد که در آن رشته‌ها (با پیکان نشان داده شده‌اند) یک **لوله β**[2] مرکزی را ایجاد می‌کنند که در آن هر رشته β در داخل توسط نواحی مارپیچی α موجود در سمت خارج فولد به یکدیگر متصل می‌شوند. فولد مشابهی دومنی از پیرووات کینـاز را ایجاد می‌کند (شکل ۳۸-۳) که هیچ هُمولوژی از نظر توالی و عملکرد ندارد. انواع متفاوتی از α,β–سوپرفولدها در دومن غیرهُمولوگوس ۱ لاکتـات دهیـدروژنـاز و دومن ۲ فسفوگلیسرات کینـاز وجـود دارند (شکل ۳۹-۳). در اینها، قطعات مرکزی در یک **صفحه $-\beta$ پیچیده**[3] همکاری می‌کنند. دوباره، قطعاتی از رشته β توسط نواحی مارپیچی α موجود در سمت خارج به یکدیگر متصل شده تا یک الگولی فولدی مشخص به‌وجود آید. یک سوپرفولد **دومن همه β** در Cu، Zn سوپـراکسید دیس‌موتاز حاوی Cu و Zn وجود دارد که در آن صفحه β موازی ناهمسو یک لوله β کلیدی یونانی[4] را به‌وجود می‌آورد (شکل ۴۰-۳). یک الگوی فولد مشابه در هر کدام از دومن‌های مربوط به ایمونوگلبولین‌ها وجود دارد. کانکانـاوالین A (شکل ۴۰-۳) یک سوپر فولد دومن همه β را نشان می‌دهد که در آن رشته‌های β موازی ناهمسو یک فولد لوله β به‌نام «رول لزج[5]» را به‌وجود می‌آورد. پروتئین‌هایی که محلول در آب نیستند، ممکن است حاوی الگوهای فولدی غیرکروی باشند (قسمت ۶-۳).



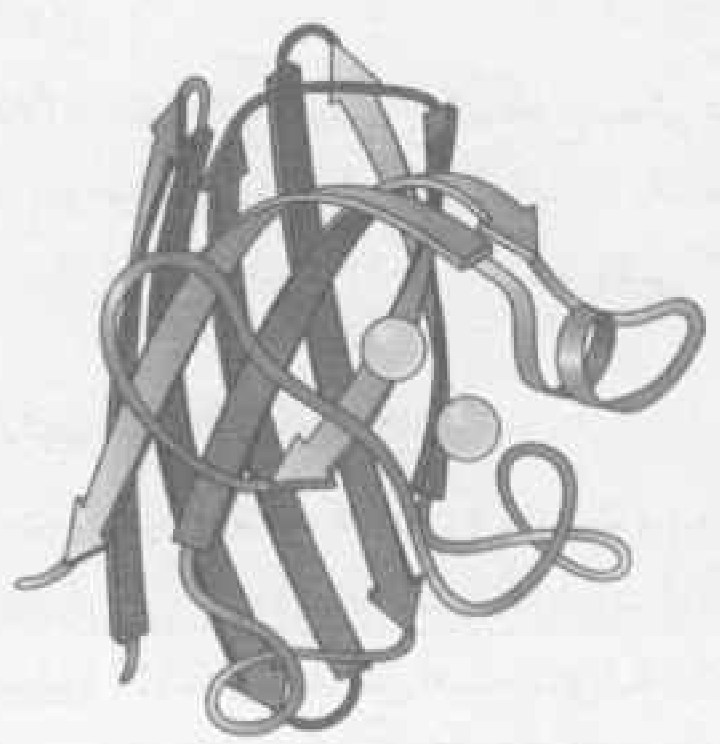
شکل ۳۷-۳ مثالی از یک یک فولد دومن همه $-\beta$ در لیزوزیم. در این تصویر و اشکال ۳۸-۳، ۳۹-۳ و ۴۰-۳، تنها حدود زنجیر پلی‌پپتیدی نشان داده شده‌اند. رشته‌های N—>C توسط پیکان‌هایی نشان داده شده‌اند که در آنها جهت پیکان به جهت انتهای آمینو به انتهای کربوکسیل اشاره دارد، نقاط درخشنده اشاره به پیوندهای دی‌سولفیدی دارنـد و حلقه‌ها کوفاکتورهای یـون فلزی را (در صورت وجود) نشان می‌دهند.

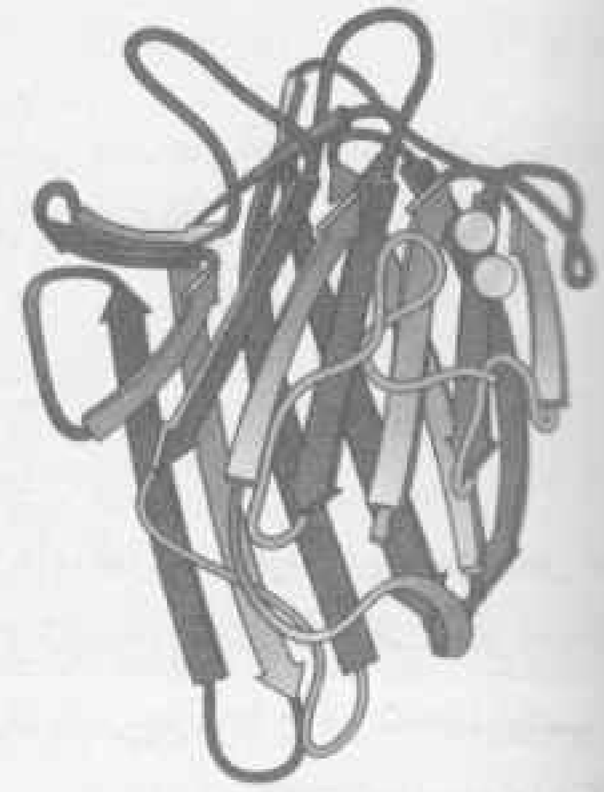
1. Superfold 2. β – Barrel 3. β – sheet – Twisted 4. β – barrel – Greek key 5. Jelly roll



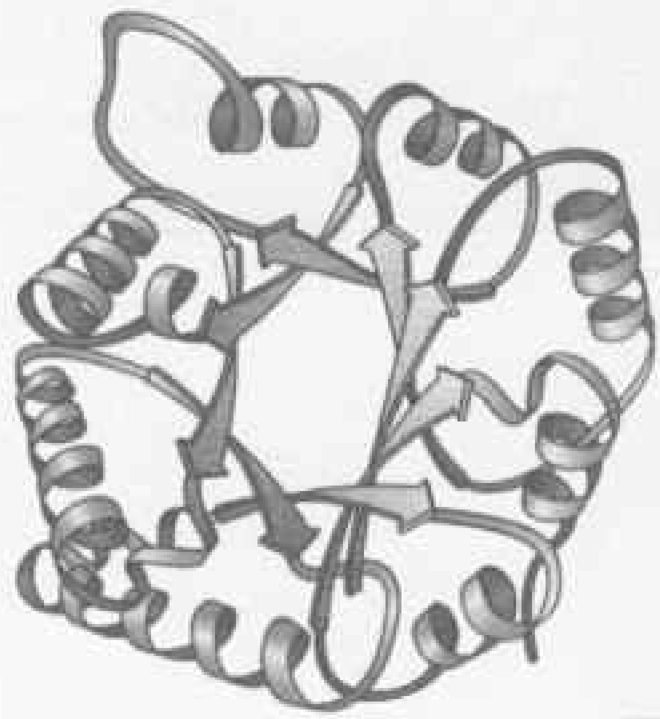


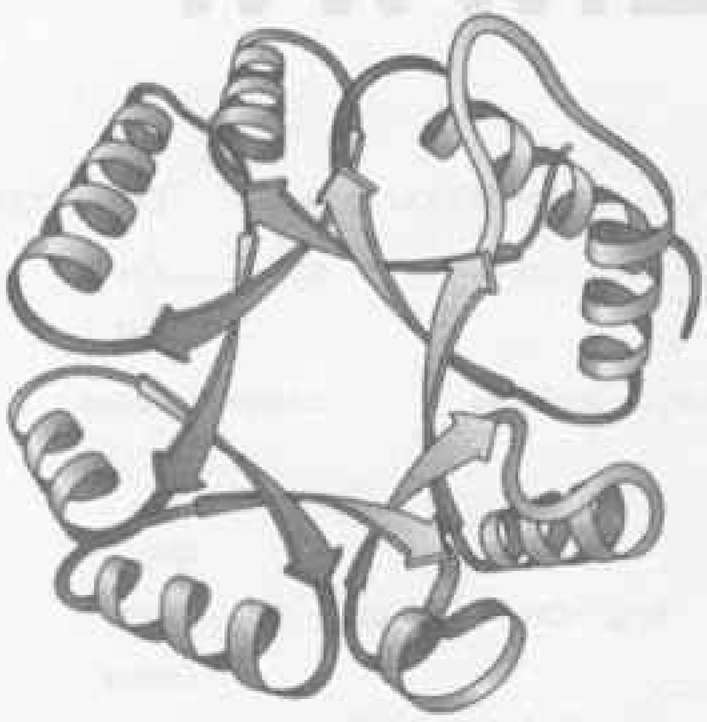
شکل ۳-۳۹   **مثالی از یک دومن α/β- دومن که در آن رشته‌های β- یک صفحه β- پیچیده کلاسیک لاکتات دهیدروژناز و فسفوگلیسرات کیناز را به وجود می‌آورند.** توضیح شکل ۳-۳۷ را ببینید. همانند فولد α/β- دومن قبلی، نواحی مارپیچ α- در داخل زنجیر پلی‌پپتیدی، به تناوب در نواحی رشته β- وجود دارند. ساختمان صفحه β- در سمت داخل قرار دارد، در حالی که قطعات مارپیچی β- در سمت خارج هستند. رشته‌های β- موجود در ساختمان β- موازی همسو هستند.





شکل ۳-۴۰   **مثال‌هایی از سوپرفولدهای دومن همه β-، فولدهای لوله کلید یونانی و رول لژ در سوپراکسید دیس‌موتاز و کانکاناوالین A نشان داده شده‌اند.** توضیح شکل ۳-۳۷ را ببینید. در تمامی فولدهای دومن همه β-، رشته‌های β- اکثراً موازی ناهمسو هستند.





شکل ۳-۳۸   **مثالی از فولد α، β دومن در تریوز فسفات ایزومراز و در دومن ۱ پیرووات کیناز.** توضیح شکل ۳-۳۷ را ببینید. در این سوپرفولد معمول، رشته‌های β- یک لوله β- را در مرکز دومن به‌وجود می‌آورند، در حالی که قطعات مارپیچ β- در سمت خارج دومن قرار دارند. جهت رشته‌های β- همسو است. در داخل زنجیر پلی‌پپتیدی، نواحی مارپیچ β- به تناوب با رشته‌های β- قرار دارند.

جدول ۱۰-۳ • درصد کلاژن موجود در بافت‌ها و اعضاء انسانی

بافت یا عضو	درصد کلاژن برحسب وزن
کبد	۴
ریه	۱۰
آئورت	۲۴-۱۰
غضروف	۵۰
قرنیه	۶۴
استخوان کورتیکال کامل	۲۳
پوست	۷۴

۶-۳ • پروتئین‌های دارای ساختمان غیرکروی

خصوصیات ساختمان پروتئینی که تاکنون مورد بحث قرار گرفته‌اند، متکی بر مشاهدات پروتئین‌های گلبولی و محلول در آب می‌باشند. **پروتئین‌های گلبولی** یک شکل کروی با اندازه‌های مختلف و حلالیت نسبتاً بالا در آب دارند که به‌عنوان کاتالیست، انتقال‌دهنده، و تنظیم‌کننده‌های مربوط به مسیرهای متابولیکی و بیان ژن عمل می‌کنند. پروتئین‌هایی که مطابق با مدل پروتئین‌های کروی محلول نیستند، پروتئین‌های فیبری و پروتئین‌های غشایی هستند. اینها پروتئین‌های غیرگلبولی می‌باشند که حلالیت کمی در آب دارند. به‌علاوه، لیپوپروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌ها حاوی اجزاء غیرپروتئینی لیپیدی و کربوهیدراتی هستند و ممکن است ساختمان‌های گلبولی داشته باشند و یا نداشته باشند.

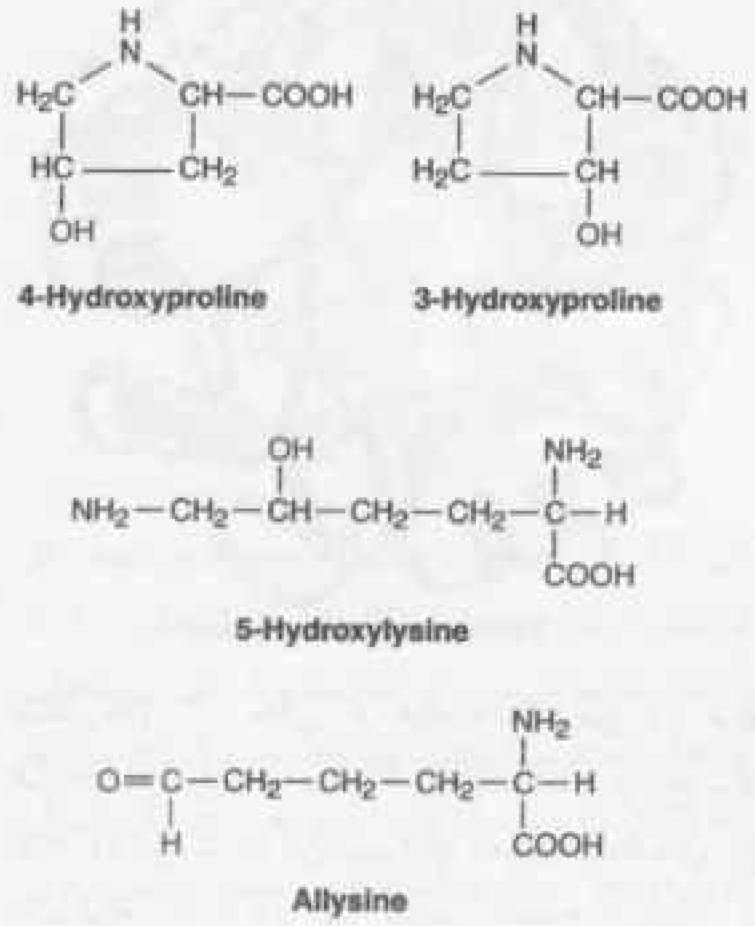
پروتئین‌های فیبری به‌طور مشخصی مقادیر زیادتر ساختمان دوم منظم، یک شکل استوانه‌ای بلند (میله‌شکل)، حلالیت پایین در آب، و یک نقش ساختمانی به‌جای نقش پویا دارند. کلاژن، کراتین و تروپومیوزین پروتئین‌های فیبری مهمی هستند. در ساختمان‌های چندرشته‌ای اینها، زنجیرهای پلی‌پپتیدی با میزان بالای ساختمان دوم منظم (مارپیچ پلی‌پرولین نوع II یا مارپیچ α) وجود دارند که به یکدیگر پیوسته و تولید کونفورماسیون‌های ابرفنری چندزنجیری می‌کنند. در هر صورت، توالی‌های اسید آمینه‌ای زنجیرها بر روی سطوح استوانه‌ای، لبه‌هایی را به‌وجود می‌آورند که سبب تثبیت تعاملات آبگریز بین زنجیرها در کونفورماسیون‌های ابرفنری می‌شوند. به‌نوبه‌خود، این ساختمان‌های ملکولی به‌شکل فیبریل‌های چندملکولی صف‌بندی می‌شوند که در برخی موارد توسط اتصالات عرضی کووالان تثبیت می‌گردند.

کلاژن

کلاژن خانواده‌ای از پروتئین‌های خارج‌سلولی در تمامی بافت‌ها و اعضاء است که شبکه‌ای را به‌وجود می‌آورد که شکل و قدرت به بافت‌ها می‌دهد. کلاژن برجسته‌ترین پروتئین در انسان است (جدول ۱۰-۳ و ارتباط بالینی ۱۳-۶).

ترکیب اسید آمینه‌ای کلاژن

ترکیب اسید آمینه‌ای کلاژن نوع I پوست و پروتئین‌های کروی ریبونوکلئاز و هموگلوبین در جدول ۱۱-۳ آورده شده است. کلاژن پوست غنی از گلیسین (شامل ۳۳٪ اسیدهای آمینه)، پرولین (۱۳٪) و اسیدهای آمینه مشتق‌شده ۴-هیدروکسی‌پرولین (۹٪) و ۵-هیدروکسی‌-لیزین (۰٫۶٪) می‌باشد (شکل ۴۱-۳). هیدروکسی‌پرولین تنها در کلاژن‌ها وجود دارد که به طریق آنزیمی از پرولین تولید می‌شود. بیشتر هیدروکسی‌پرولین‌ها در موقعیت ۴ (کربن γ) گروه هیدروکسیل دارند، هر چند میزان کمی ۳-هیدروکسی‌پرولین نیز تولید می‌شود (جدول ۱۱-۳). کلاژن‌ها ساختمان گلیکوپروتئینی دارند که در آنها کربوهیدرات



شکل ۴۱-۳ مشتقات اسیدهای آمینه در کلاژن. کربوهیدرات از طریق یک اتصال گلیکوزیدی نوع III به گروه ۵-هیدروکسیل در ۵-هیدروکسی لیزین اتصال می‌یابد (شکل ۴۹-۳ را ببینید).

جدول ۱۱-۳ • مقایسه محتوای اسید آمینه‌ای کلاژن (نوع I) پوست انسان و الاستین بالغ با دو پروتئین گلبولی شاخص[1]

اسید آمینه	کلاژن (پوست انسان)	الاستین (پستانداران)	ریبونوکلئاز (گاو)	هموگلوبین (انسان)
اسیدهای آمینه معمول		درصد کل		
آلانین	۱۱	۲۲	۸	۹
آرژینین	۵	۰٫۹	۵	۳
آسپاراژین			۸	۳
آسپارتات	۵	۱	۱۵	۱۰
سیستئین	۰	۰	۰	۱
گلوتامات	۷	۲	۱۲	۶
گلوتامین			۶	۱
گلیسین	۳۳	۳۱	۲	۴
هیستیدین	۰٫۵	۰٫۱	۴	۹
ایزولوسین	۱	۲	۳	۰
لوسین	۲	۶	۲	۱۴
لیزین	۳	۰٫۸	۱۱	۱۰
متیونین	۰٫۶	۰٫۲	۴	۱
فنیل‌آلانین	۱	۳	۴	۷
پرولین	۱۳	۱۱	۴	۵
سرین	۴		۱۱	۴
ترئونین	۲		۹	۵
تریپتوفان	۲		۹	۲
تیروزین	۰٫۳		۸	۳
والین	۲		۸	۱۰
مشتق اسیدهای آمینه				
سیستین	۰		۷	۰
۳-هیدروکسی‌پرولین	۰٫۱		۰	۰
۴-هیدروکسی‌پرولین	۹	۱	۰	۰
۵-هیدروکسی‌پرولین	۰٫۶		۰	۰
دسموزین و ایزودسموزین	۰	۱	۰	۰

[1] محل‌های فاقد درصد بر تفاوت‌های مهم ترکیب اسید آمینه‌ای بین پروتئین‌های فیبری (کلاژن و الاستین) و پروتئین‌های گلبولی شاخص تأکید دارند.

از طریق یک پیوند O-گلیکوزیدی به گروه هیدروکسی کربن δ به ۵-هیدروکسی‌لیزین متصل می‌باشد.

جدول ۱۲-۳ • طبقه‌بندی انواع کلاژن

نوع	نمایش زنجیری	توزیع بافتی	خصوصیات
I	$[\alpha1(I)]_2\alpha2(I)$	استخوان، پوست، تاندون، بافت اسکار، دریچه قلب، دیواره روده و رحم	کربوهیدرات پایین؛<۱۰ هیدروکسی‌لیزین در هر زنجیر
II	$[\alpha1(II)]_3$	غضروف، زجاجیه	۱۰٪ کربوهیدرات؛ > ۲۰ هیدروکسی‌لیزین در هر زنجیر
III	$[\alpha1(III)]_3$	عروق خونی، پوست نوزاد، بافت اسکاری، دیواره روده و رحم	کربوهیدرات پایین؛ هیدروکسی‌پرولین و گلیسین بالا؛ حاوی سیستئین
IV	$[\alpha1(IV)]_3$ $[\alpha2(IV)]_3$	غشاء پایه، کپسول عدسی	۳- هیدروکسی‌پرولین بالا؛ > ۴۰ هیدروکسی‌لیزین در هر زنجیر؛ آلانین و آرژنین پایین؛ حاوی سیستئین؛ کربوهیدرات بالا (۱۵٪)
V	$[\alpha1(V)]_3\alpha2(V)$ $[\alpha1(V)]_3$ $\alpha1(V)\alpha2(V)\alpha3(V)$	سطوح سلولی یا ماتریکس خارج‌سلولی همراه با سلول؛ توزیع وسیع به مقادیر کم	کربوهیدرات بالا، هیدروکسی‌لیزین و گلیسین نسبتاً بالا
VI	$\alpha1(VI)\alpha2(VI)$ $\alpha3(VI)$	اینتیمای آئورتی، جفت، کلیه، و پوست به‌میزان کم	دومن‌های گلبولی نسبتاً بزرگ در ناحیه تلوپپتیدی؛ سیستئین و تیروزین بالا؛ وزن ملکولی نسبتاً پایین؛ مقادیر اکی‌مولار هیدروکسی‌لیزین و هیدروکسی‌پرولین (~۱۶۰ kDa)

توالی اسید آمینه‌ای کلاژن

خانواده کلاژن شامل پلی‌پپتیدهایی مشتق از ۴۰ ژن کلاژنی شناخته‌شده می‌باشد که تولید حدود ۲۰ نوع مختلف کلاژن می‌کنند. هر ملکول کلاژن بالغ یا تروپوکلاژن شامل سه زنجیر پلی‌پپتیدی است. برخی از انواع کلاژن‌ها متشکل از سه زنجیر پلی‌پپتیدی یکسان هستند. در کلاژن نوع I (جدول ۱۲-۳) دو زنجیر $\alpha1(I)$ و یک زنجیر $\alpha2(I)$ وجود دارد. کلاژن نوع V متشکل از سه زنجیر متفاوت است که با $\alpha1(V)$، $\alpha2(V)$ و $\alpha3(V)$ مشخص می‌گردند. کلاژن‌ها از نظر توالی اسید آمینه‌ای با یکدیگر اختلاف دارند، ولی نواحی بزرگی از توالی همولوگوس در میان تمامی انواع مختلف کلاژن‌ها وجود دارند. در تمامی انواع کلاژن‌ها نواحی از تری‌پپتیدهای **Gly-Pro-Y** و **Gly-X-Hyp** وجود دارند که به‌صورت پشت سرهم صدها بار تکرار شده‌اند. در پلی‌پپتیدهای کلاژن نوع I، توالی‌های سه‌تایی بیش از ۶۰۰ اسید آمینه از ۱۰۰۰ اسید آمینه موجود در هر پلی‌پپتید را شامل می‌گردند. کلاژن‌ها از نظر جزء کربوهیدراتی با یکدیگر اختلاف دارند. برخی خصوصیات کلاژن‌های نوع I تا VI در جدول ۱۲-۳ خلاصه شده‌اند.

ساختمان کلاژن

زنجیرهای پلی‌پپتیدی سنتتیک تنها حاوی پرولین (پلی‌پرولین؛ **poly-Pro**) را می‌توان در آزمایشگاه تهیه نمود که در محلول‌های آبی یک ساختمان مارپیچی ثانویه متفاوت از مارپیچ α اتخاذ می‌کنند. **poly-Pro** یک مارپیچ امتدادیافته شدیداً پیچیده را با سه ریشه در هر دور (n=۳) به‌وجود می‌آورد. این مارپیچ همراه با تمامی پیوندهای پپتیدی ترانس،

مارپیچ **پلی‌پرولینی نوع II** می‌باشد (برای تفاوت‌های موجود در بین پیوندهای پپتیدی سیس و ترانس شکل ۱۲-۳ را ببینید) مارپیچ **poly-Pro** شباهت زیادی با مارپیچی دارد که در زنجیرهای کلاژن موجود در نواحی یافت می‌شود که حاوی یک پرولین یا هیدروکسی-پرولین در تقریباً هر موقعیت سوم در توالی‌های تری‌پپتیدی تکراری است؛ این موضوع نشان می‌دهد که نیروهای ترمودینامیکی منتهی به تولید مارپیچ کلاژن ناشی از خصوصیات پرولین هستند.

در مارپیچ پلی‌پرولین نوع II، صفحه هر کدام از پیوندهای پپتیدی عمود بر محور مارپیچ است. لذا اتم‌های اکسیژن و نیتروژن پیوند پپتیدی موجود در یک پلی‌پرولین نوع II به‌سمت زنجیرهای پلی‌پپتیدی مجاور بوده و پیوندهای هیدروژنی بین‌زنجیری قوی را به وجود می‌آورند. این برخلاف مارپیچ α است که در آن صفحه پیوند پپتیدی موازی با محور است که در آن NH اکسیژن کربونیل پپتیدها تنها پیوندهای درون‌زنجیری ایجاد می‌کنند.

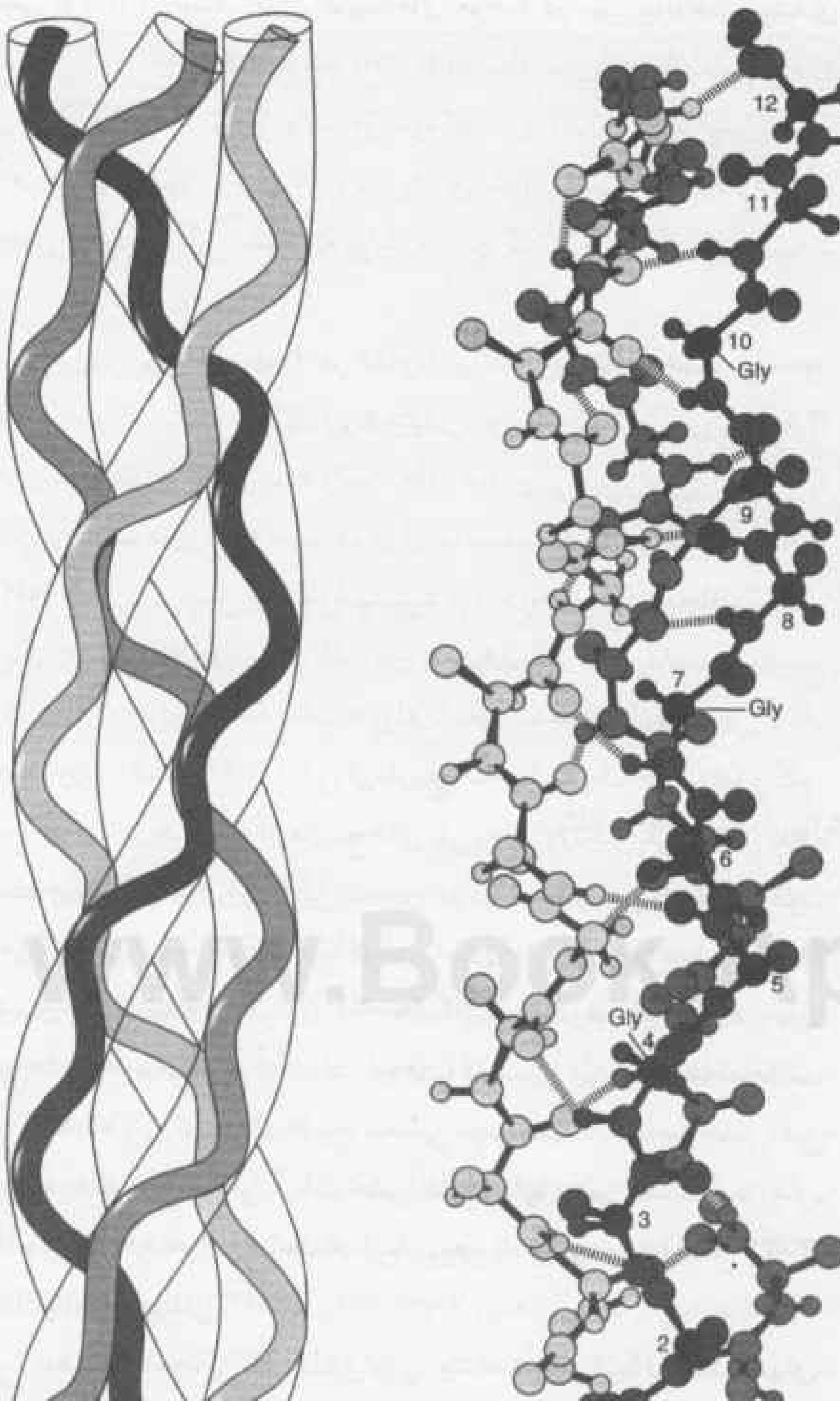
سه زنجیر یک ملکول کلاژن که هر کدام از زنجیرها یک کونفورماسیون مارپیچ پلی‌پرولینی نوع II را دارد، حول یکدیگر تاب خورده تا یک ساختمان ابرمارپیچی به‌نام ابرمارپیچ را به‌وجود آورند (شکل ۴۲-۳). این **ابرمارپیچ** سه-رشته یک خیز[1] (d) و گام[2] (p) متفاوت از نوع موجود در هر کدام از مارپیچ‌های پلی‌پرولینی زنجیر پلی‌پپتیدی دارد. این ابرمارپیچ توسط پیوندهای هیدروژنی بین‌زنجیری در میان سه زنجیر پایدار می‌شود، زیرا گلیسین در هر موقعیت سوم وجود دارد. با کونفورماسیون مارپیچی پلی‌پرولینی نوع II هر زنجیر پلی‌پپتیدی با سه ریشه در هر دور (n=۳)، گلیسین یک **لبه غیرقطبی** در طول هر کدام از مارپیچ‌ها به‌وجود می‌آورد. آنگاه این لبه‌های گلیسینی بین زنجیرها تعاملات غیرقطبی ایجاد می‌کنند که برای تثبیت ابرمارپیچ سه‌تایی مهم است. هر زنجیر جانبی غیر از زنجیر جانبی مربوط به گلیسین در طول لبه غیرقطبی چنین اجازه‌ای نمی‌دهد تا زنجیرهای مجاور در کنار یکدیگر قرار گرفته و این ساختمان ابرمارپیچی را به‌وجود آورند (شکل ۴۲-۳، استئوژنز ایمپرفکتا، و ارتباط بالینی ۱۳-۶).

در کلاژن نوع I، مارپیچ سه‌تایی در بیشتر توالی امتداد دارد و تنها قطعات انتهای کربوکسیل و انتهای آمینو (تحت عنوان **تلوپپتیدها**)، کونفورماسیون مارپیچ-سه‌تایی را ندارند. ملکول کلاژن نوع I یک ساختمان استوانه‌ای بسیار بلند با ۳۰۰۰A طول و تنها ۱۵A پهنا می‌باشد. در انواع دیگر کلاژن، نواحی ابرمارپیچی ممکن است به‌طور دوره‌ای توسط نواحی کروی شکسته شوند.

تولید اتصالات عرضی کووالان در کلاژن

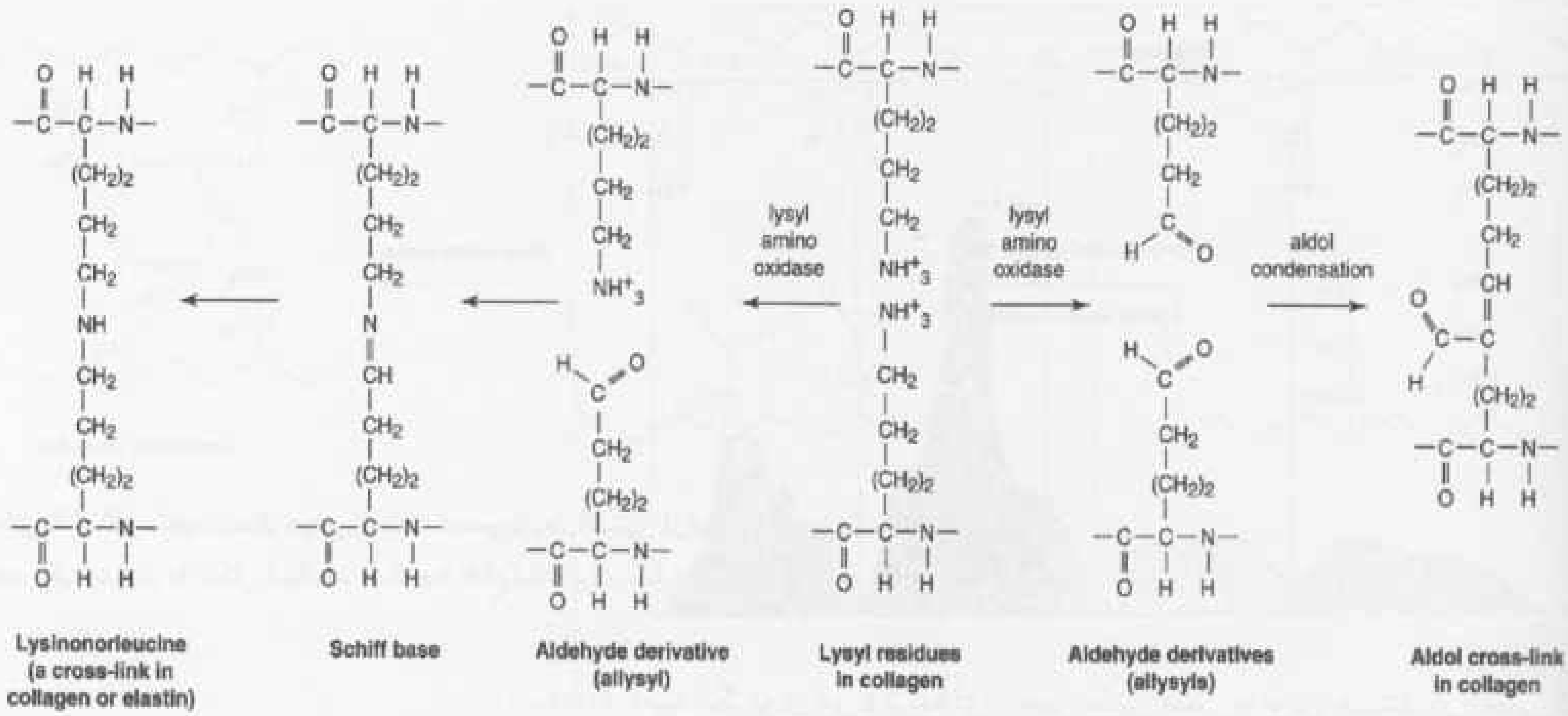
یک آنزیم خارج‌سلولی بر روی ملکول‌های پروکلاژن اثر کرده (ص. ۱۴۵) تا گروه ε-آمینوی برخی زنجیرهای جانبی لیزینی را به یک δ-آلدئید تبدیل کنند (شکل ۴۳-۳). مشتق

1. Rise 2. Pitch



**شکل ۴۲-۳ نمایشی از کلاژن که ضر
گلیسین در هر ریشه سوم را نشان می‌دهد تا
زنجیرهای مختلف در داخل این ساختمان ،
نزدیک قرار گیرند.** (a) مدل روبانی ساختمان ابر
با هر زنجیر به شکل یک مارپیچ نوع II پلی
جزئیات بیشتری از کونفورماسیون ابرفنری. تم
کربن – α شماره‌گذاری شده‌اند و پیوندهای هیدر
با خطوط منقطع نشان داده شده‌اند.

اسید آمینه **آلیزین** می‌باشد. زنجیر جانبی آلدئیدی تازه‌تولید، به‌طور خودبه‌خودی متحمل واکنش‌های افزودن نوکلئوفیلی با گروه‌های ε–آمینوی لیزین تغییرنیافته و اتم‌های کربن δ سایر گروه‌های آلدئیدی آلیزینی می‌شود. این اتصالات کووالان می‌توانند بین زنجیرها در داخل ساختمان ابرمارپیچی یا بین ملکول‌های کلاژن ابرمارپیچی مجاور موجود در یک فیبریل کلاژن به وجود آیند (برای بحث پیرامون سنتز کلاژن به (ص ۳۳۳). مراجعه کنید).



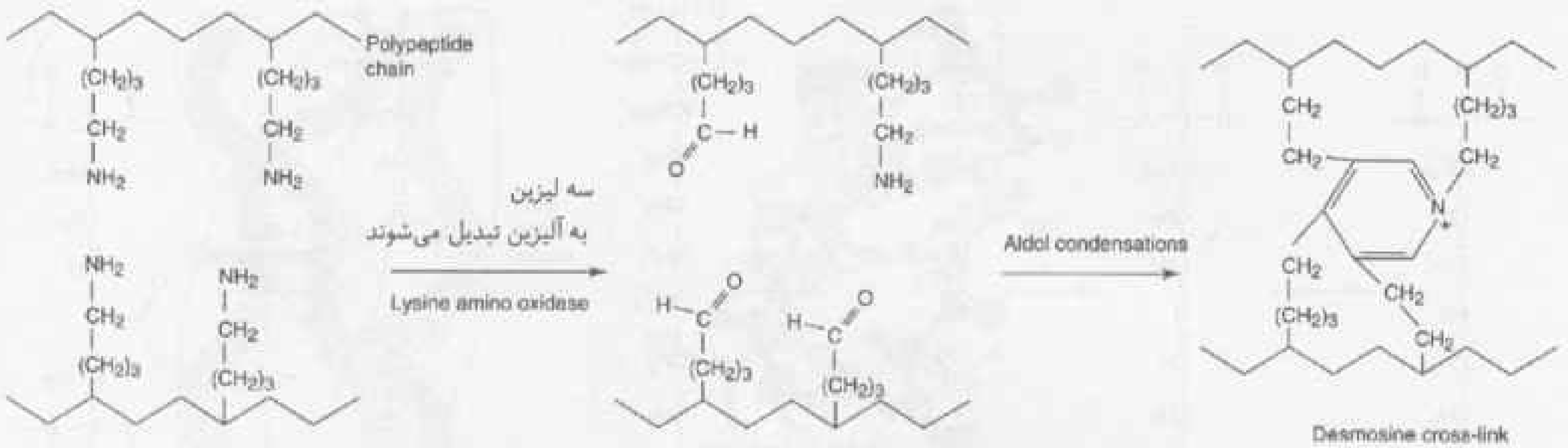
شکل ۴۳-۳ **اتصالات عرضی کووالان در کلاژن از طریق ترکیبات واسط آلیزینی.** تولید آلیزین‌ها توسط لیزیل آمینو اکسیداز کاتالیز می‌شود.

الاستین یک پروتئین رشته‌ای با اتصالات عرضی حاصل از آلیزین می‌باشد

الاستین به بافت‌ها و اعضاء ظرفیت امتدادیافتن بدون پارگی را می‌دهد. به‌دلیل عملکرد ساختمانی و عدم‌حلالیت نسبی در آب، کلاژن همانند یک پروتئین فیبری است؛ الاستین در رباط‌ها، ریه‌ها، دیواره شریان‌ها، و پوست فراوان است. الاستین فاقد یک ساختمان دوم منظم است. همانند حالت موجود در کلاژن، آلیزین‌ها در **الاستین** اتصالات عرضی ایجاد می‌کنند. یک **لیزین آمینو اکسیداز** زنجیر جانبی لیزین‌های موجود در توالی -Lys–Ala–Ala–Lys- و -Lys-Ala-Ala-Ala-Lys- را به آلیزین تبدیل می‌کند. سه آلیزین و یک لیزین تغییرنیافته از نواحی مختلف در زنجیرهای پلی‌پپتیدی، با یکدیگر واکنش نموده تا ساختمان هترو-سیکلیک دسموزین یا ایـزودسموزین را تولید کنند که در زنجیرهای پلی‌پپتیدی موجود در شبکه‌های الاستینی، اتصالات عرضی را به‌وجود می‌آورند (شکل ۴۴-۳).

کراتین و تروپومیوزین

کراتین و تروپومیوزین پروتئین‌های فیبری هستند که در آنها هر زنجیر پلی‌پپتیدی یک مارپیچ α است. کراتین در لایه اپیدرمی پوست، در ناخن‌ها، و در مو یافت می‌شود. توالی‌های موجود در هر دو پروتئین، تکرارهای پشت‌سرهمی از قطعات هفت ریشه‌ای (هپتاد) را نشان می‌دهند که در آنها اولین و چهارمین اسید آمینه زنجیر جانبی آبگریز و پنجمین و هفتمین اسید آمینه زنجیرهای جانبی قطبی دارند. تکرار زنجیرهای جانبی آبگریز و قطبی در قطعات هپتاد با فرمولاسیون $(a\text{-}b\text{-}c\text{-}d\text{-}e\text{-}f\text{-}g)_i$ نشان داده می‌شود که در آن a و d



شکل ۴۴-۳ تولید اتصال عرضی کووالان دسموزین در الاستین از لیزین و آلیزین‌ها.
زنجیر پلی‌پپتیدی به شکل شماتیک با خطوط قطع‌کننده برای اشاره به کربن‌های ـ α نشان داده شده‌اند.

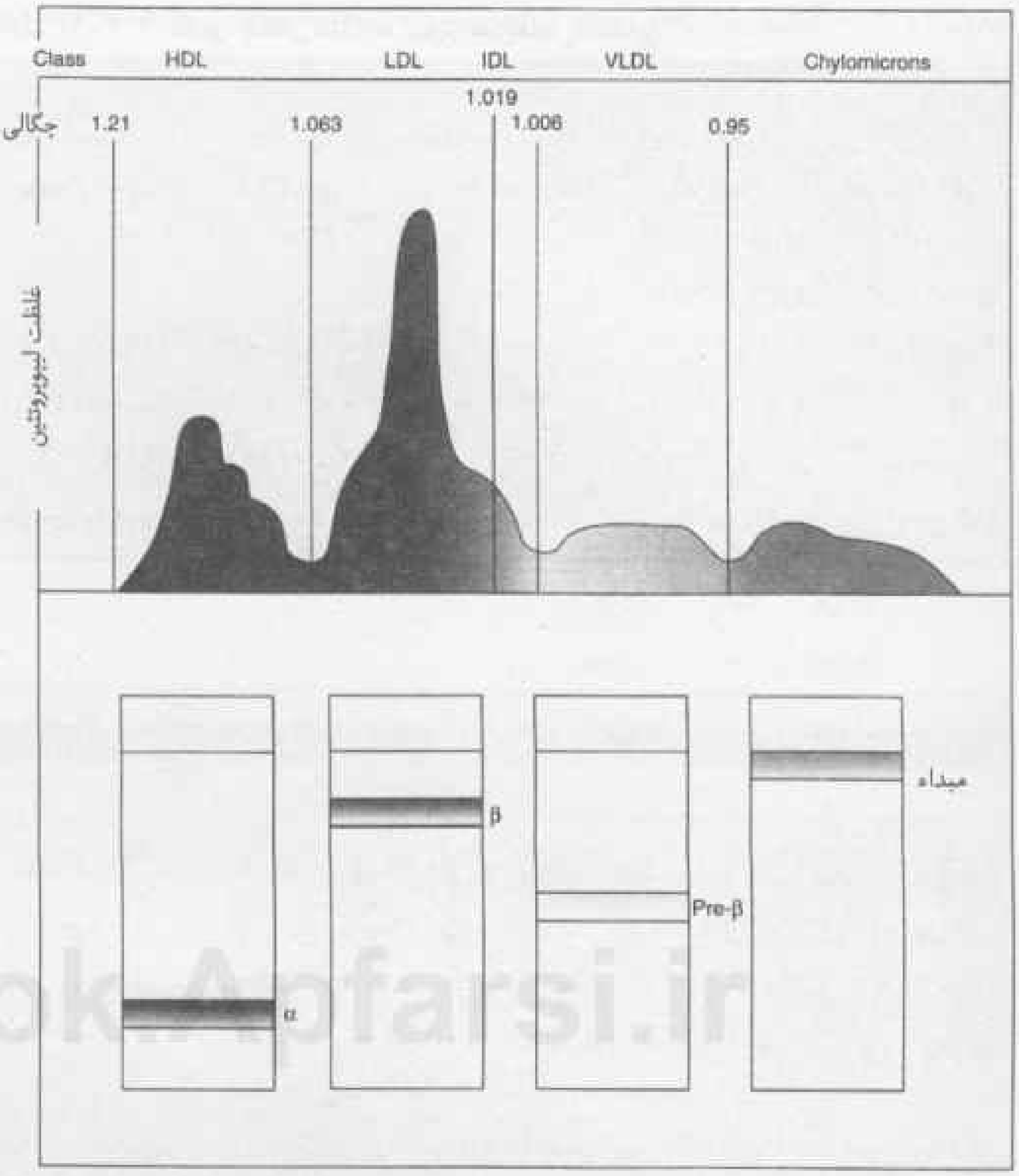
اسیدهای آمینه آبگریز و e و g گروه‌های زنجیر جانبی قطبی یا یونیزه هستند. از آنجایی که یک قطعه هفت اسید آمینه‌ای شامل دو دور کامل از مارپیچ α ($n=3/6$) می‌باشد، این ریشه‌های قطبی موجود در a و d طوری قرار می‌گیرند که یک لبه غیرقطبی در طول یک سمت مارپیچ α به‌وجود آید (شکل ۴۵-۳). این لبه غیرقطبی با لبه‌های غیرقطبی پلی‌پپتید مربوط به زنجیرهای کراتین α دیگر تعامل نموده تا یک ساختمان ابرمارپیچی **فنر-فنری شده**[1] حاوی دو یا چهار زنجیر پلی‌پپتیدی را ایجاد کنند. هر پلی‌پپتید همچنین یک لبه قطبی، به‌واسطه ریشه‌های e و g، دارد که در سمت خارج ابرمارپیچ با آب تعامل نموده و ابرمارپیچ را تثبیت می‌کنند.

لیپوپروتئین‌های پلاسمایی کمپلکس‌هایی از لیپیدها و پروتئین‌ها هستند

لیپوپروتئین‌های پلاسمایی کمپلکس‌هایی از پروتئین‌ها و لیپیدها هستند که تجمعاتی با استوکیومتری حدودی بین اجزاء پروتئینی و لیپیدی به وجود می‌آورند. پیوندهای کووالان بین ملکول‌های لیپید و پروتئین وجود ندارند و ملکول‌های موجود در این کمپلکس از طریق تعاملات غیرکووالان در ساختمان یک ذره قرار گرفته‌اند (ص ۹۷۲). ذرات لیپوپروتئینی در انتقال لیپیدها از بافتی به بافت دیگر نقش دارند و در متابولیسم لیپیدها همکاری می‌کنند (ص ۹۷۶). در یک انسان ناشتای طبیعی چهار کلاس لیپوپروتئین‌ها در پلاسما وجود دارند (جدول ۱۳-۳) و در حالت بعد از جذب، کلاس پنجمی تحت عنوان شیلومیکرون‌ها نیز وجود دارد. تمایز این کلاس‌ها براساس چگالی خود می‌باشد که به طریق اولتراسانتریفوژ و الکتروفورز تعیین می‌شود (شکل ۴۶-۳). تغییر در غلظت‌های نسبی برای آترواسکلروز، به‌عنوان یکی از بیماری‌های مهم انسانی (ارتباط بالینی ۳-۳)، ارزش پیش‌بینی‌کنندگی دارد. اجزاء پروتئینی این ذرات را آپولیپوپروتئین می‌نامند و هر کلاس حاوی ترکیب **آپولیپوپروتئینی**

شکل ۴۵-۳ تعامل لبه‌های غیرقطبی دو زنجیر با کونفورماسیون مارپیچی ـ α همانند حالت موجود در کراتین و تروپومیزوزین. تعامل ریشه‌های غیرقطبی a-d و a'-d' دو مارپیچ ـ α که به‌طور موازی با جهت انتهای آمینو (بالا) به انتهای کربوکسیل قرار گرفته‌اند.

1. Coiled-coil



شکل ۴۶-۳ ارتباط کلاس‌های مختلف لیپوپروتئین‌های پلاسمایی با چگالی متفاوت و حرکت الکتروفورتیک آنها در الکتروفورز پلاسما. در دیاگرام بالا یک الگوی اولترا سانتریفوز Schlieren نشان داده شده است. در پایین، الکتروفورز بر روی محیط پشتیبان کاغذی، حرکت کلاس‌های لیپوپروتئینی مختلف پلاسما نسبت به باندهای گلوبینی α- و β- را نشان می‌دهد.

مشخصی است. برجسته‌ترین آپولیپوپروتئین‌ها (جدول ۱۴-۳)، شامل آپو **A-I** در لیپو-پروتئین‌های با چگالی بالا[1] (HDLs)؛ آپو **B** در لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین[2] (LDLs)، لیپوپروتئین‌های با چگالی متوسط[3] (IDLs)، و لیپوپروتئین‌های با چگالی بسیار پایین[4] (VLDLs)؛ و آپو **C** در IDLs و VLDLs می‌باشند. هر کدام از کلاس‌های آپولیپو-پروتئینی از نظر ژنتیکی و ساختمانی متفاوت هستند (ارتباط بالینی ۴-۳). آپولیپوپروتئین‌ها از kDa ۶ (آپو C-I) تا kDa ۵۵۰ برای آپو B-100 متفاوت هستند. آپو B-100 پلی‌پپتید بلندی با ۴۵۳۶ اسید آمینه است که در شیلومیکرون‌ها شکل ناقص آن تحت عنوان آپو B-48 (شامل تنها ۲۵۱۲ ریشه انتهای آمینو) وجود دارد.

مدلی برای ساختمان یک ذره VLDL در شکل ۴۷-۳ نشان داده شده است. در داخل لیپیدهای خنثی نظیر استرهای کلستریل و تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها وجود دارند. در اطراف این هسته داخلی لیپیدهای خنثی، لایه‌ای به ضخامت حدود ۲۰Å وجود دارد که در داخل آن

1. High-density lipoproteins
2. Low-density lipoproteins
3. Intermediate-density lipoproteins
4. Very low-density lipoproteins

جدول ۱۳-۳ • کلاس چگالی هیدراته لیپوپروتئین‌های پلاسمایی

فراکسیون لیپوپروتئینی	چگالی (gmL^{-1})	سرعت فلوتاسیون، S_f (واحد سودبرگ)	وزن ملکولی (دالتون)	قطر ذره ($\AA$)
HDL	۱٫۰۶۳–۱٫۲۱۰		HDL_2, ۴×۱۰^{۵}	۷۰–۱۳۰
			HDL_3, ۲×۱۰^{۵}	۵۰–۱۰۰
$LDL (or\ LDL_2)$	۱٫۰۱۹–۱٫۰۶۳	۰–۱۲	۲×۱۰^{۶}	۲۰۰–۲۸۰
$IDL (or\ LDL_1)$	۱٫۰۰۶–۱٫۰۱۹	۱۲–۲۰	$۴٫۵\times۱۰^{۶}$	۲۵۰
VLDL	۰٫۹۵–۱٫۰۰۶	۲۰–۴۰۰	$۵\times۱۰^{۶}–۱۰^{۷}$	۲۵۰–۷۵۰
Chylomicrons	<۰٫۹۵	>۴۰۰	$۱۰^{۹}\times۱۰^{۱۰}$	$۱۰^{۳}\times۱۰^{۴}$

ارتباط بالینی ۳-۳

هیپرلیپوپروتئینمی

هیپرلیپوپروتئینمی‌ها (OMIM۶۰۸۰۸۳) ناهنجاری‌های مرتبط با سرعت سنتز یا پاکسازی لیپوپروتئین‌ها از گردش خون هستند. معمولاً این اختلالات با اندازه‌گیری مقادیر پلاسمایی تری‌آسیل‌گلیسرول و کلسترول آشکار شده و براساس اینکه چه کلاسی از لیپوپروتئین‌ها افزایش یافته است، طبقه‌بندی می‌شوند.

هیپرشیلومیکرونمی نوع I ناشی از تجمع شیلومیکرون‌ها است. دو شکل ژنتیکی شناخته شده است: کمبود لیپوپروتئین لیپاز و کمبود آپو CII. آپو CII برای فعالیت کامل لیپوپروتئین لیپاز مورد نیاز می‌باشد. مبتلایان به هیپرلیپیدمی نوع I مقادیر بیش از حد تری‌آسیل‌گلیسرول پلاسمایی (بیش از mg/dL ۱۰۰۰) را دارند و از گزانتوماهای بثوراتی (رسوب مایل به زرد تری‌آسیل‌گلیسرول در پوست) و پانکراتیت رنج می‌برند.

هیپرلیپوپروتئینمی نوع II با افزایش مقادیر LDL مشخص می‌شود. اکثر موارد ناشی از نقص‌های ژنتیکی در سنتز، پردازش یا عملکرد گیرنده LDL هستند. هتروزیگوت‌ها افزایش مقادیر LDL را دارند؛ لذا این صفت به‌صورت غالب بیان می‌شود. بیماران هُموزیگوس مقادیر بسیار بالای LDL را دارند و ممکن است قبل از ۲۰ سالگی دچار سکته قلبی شوند.

هیپرلیپوپروتئینمی نوع III ناشی از ناهنجاری‌های آپو E است که با برداشت باقیمانده‌های شیلومیکرون و VLDL تداخل می‌کند. هیپو-تیروئیدیسم می‌تواند سبب هیپرلیپوپروتئینمی بسیار مشابهی شود. این بیماران افزایش خطر آترواسکلروز را دارند.

هیپرلیپوپروتئینمی نوع IV معمول‌ترین ناهنجاری است. مقادیر VLDL، اغلب به‌دلیل چاقی، مصرف نابه‌جای الکل، یا دیابت، بالا است. اشکال خانوادگی نیز شناخته شده است.

هیپرلیپوپروتئینمی نوع V همانند نوع I همراه با افزایش میزان تری-آسیل‌گلیسرول و ایجاد گزانتومای بثوراتی است.

هیپرکلسترولمی در برخی انواع بیماری کبدی نیز مشاهده می‌گردد که در آنها ترشح صفراوی کلسترول کاهش دارد. یک لیپوپروتئین غیرطبیعی به‌نام لیپوپروتئین X تجمع می‌یابد. این ناهنجاری همراه با افزایش بیماری قلبی-عروقی ناشی از آترواسکلروز نیست.

پروتئین‌ها و لیپیدهای آمفوتری بارداری نظیر کلسترول غیراستریفیه و فسفاتیدیل‌کولین‌ها وجود دارند (ص ۶۱۹). پروتئین‌ها و لیپیدهای آمفوتری موجود در این لایه، نواحی غیرقطبی خود را به درون ذره می‌فرستند و گروه‌های باردار آنها به‌سمت خارج می‌باشد تا با یکدیگر و با آب تعامل کنند.

جدول ۱۴-۳ • آپولیپوپروتئین‌های موجود در لیپوپروتئین‌های پلاسمایی (مقادیر برحسب درصد میزان کل پروتئین موجود)[1]

Apolipoprotein	HDL_2	HDL_3	*LDL*	*IDL*	*VLDL*	*Chylomicrons*
ApoA-I	۸۵	۷۰-۷۵	ناچیز	۰	۰-۳	۰-۳
ApoA-II	۵	۲۰	ناچیز	۰	۰-۰٫۵	۰-۱٫۵
ApoD	۰	۱-۲			۰	۱
ApoB	۰-۲	۰	۹۵-۱۰۰	۵۰-۶۰	۴۰-۵۰	۲۰-۲۲[2]
ApoC-I	۱-۲	۱-۲	۰-۵	<۱	۵	۵-۱۰
ApoC-II	۱	۱	۰٫۵	۲٫۵	۱۰	۱۵
ApoC-III	۲-۳	۲-۳	۰-۵	۱۷	۲۰-۲۵	۴۰
ApoE	ناچیز	۰-۵	۰	۱۵-۲۰	۵-۱۰	۵
ApoF	ناچیز	ناچیز				
ApoG	ناچیز	ناچیز				

[1] مقادیر در بین آزمایشگاه‌های مختلف، متفاوت است. [2] اساساً آپو B-48.

ارتباط بالینی ۴-۳

هیپولیپوپروتئینمی

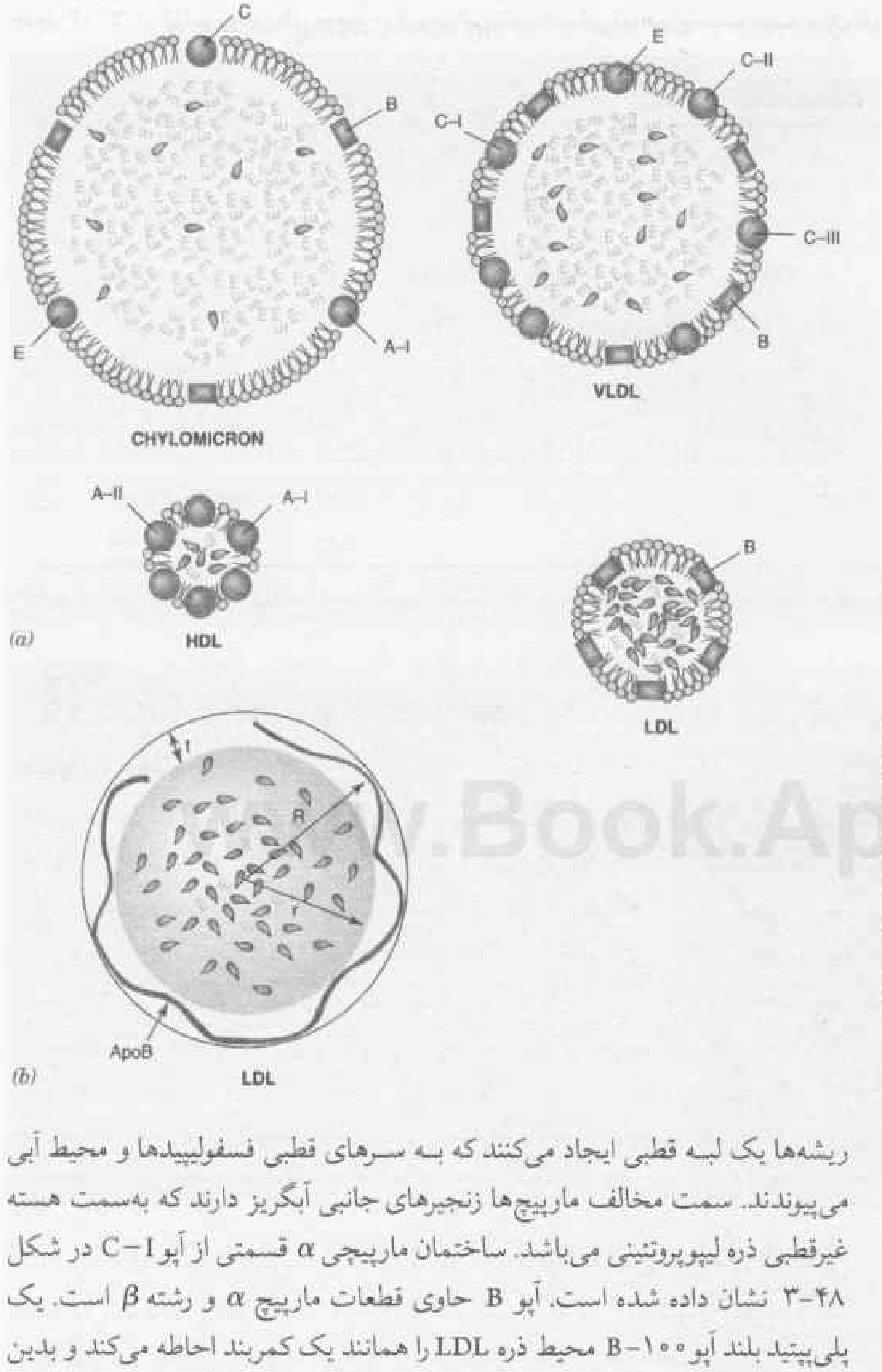
آبتالیپوپروتئینمی یک بیماری ژنتیکی است که با عدم وجود ذرات شیلومیکرون، VLDL، و LDL به‌دلیل ناتوانی در سنتز آپولیپوپروتئین‌های B-100 و B-48 مشخص می‌گردد. تجمع قطرات لیپید در سلول‌های روده کوچک، سوء جذب چربی، آکانتوسیتوز (گلبول‌های قرمز خون خاردار)، بیماری عصبی (رتینیت پیگمنتوزا، آتاکسی و عقب‌ماندگی) وجود دارد.

بیماری تانژیر، کمبود α-لیپوپروتئین، یک بیماری اتوزومال مغلوب نادر است که در آن میزان HDL حدود ۵-۱٪ میزان طبیعی است. خصوصیات بالینی ناشی از تجمع کلسترول در سیستم لنفورتیکولار است که ممکن است منجر به بزرگی کبد و بزرگی طحال شود. کلسترول و فسفولیپیدهای پلاسمایی شدیداً کاهش می‌یابند.

کمبود آنزیم لسیتین:کلسترول آسیل ترانسفراز یک بیماری نادر است که منجر به تولید لیپوپروتئین X می‌شود (ارتباط بالینی ۵-۳ را ببینید). سایر خصوصیات شامل کاهش باندهای لیپوپروتئین α و لیپوپروتئین per-β به همراه افزایش لیپوپروتئین β می‌باشد که دلیل آن وجود لیپوپروتئین X در الکتروفورز است.

این مدل ذره لیپوپروتئینی برای تمامی کلاس‌های مربوط به لیپوپروتئین‌های پلاسمایی کاربرد دارد. با کاهش قطر ذره، لایه خارج درصد بیشتری از کل ذره را شامل می‌شود. لذا ذرات کوچکتر درصد بیشتری از پروتئین‌های سطحی و ملکول‌های آمفوتری را در مقایسه با ذرات بزرگتر دارند. از اینرو، ذرات HDL، که بسیار کوچکتر از VLDL هستند، شامل ۴۵٪ پروتئین و ۵۵٪ لیپید هستند، در حالی‌که ذرات VLDL شامل ۱۰٪ پروتئین و ۹۰٪ لیپید می‌باشند (جدول ۱۵-۳).

آپولیپوپروتئین‌ها وقتی به لیپیدها می‌پیوندند، محتوای بالای مارپیچ α را دارند. نواحی مارپیچی اینها دوگانه‌دوست هستند، زیرا هر اسید آمینه سوم یا چهارم باردار است. این



شکل ۴۷-۳ ساختمان عمومی لیپوپروتئین‌های پلاسمایی. (a) مدل ذره کروی متشکل از یک هسته مرکزی از تری‌گلیسریدها (Eهای زرد) و استرهای کلسترول (قطرات نارنجی) با یک لایه سطحی به ضخامت حدود ۲۰Å از آپولیپوپروتئین‌ها (حروف)، فسفولیپیدها و کلسترول غیراستریفیه. آپولیپوپروتئین‌ها طوری در داخل این ذرات فرو رفته‌اند که لبه‌های آبگریز آنها به‌سمت مرکز و لبه‌های آبدوست آنها به‌سمت خارج می‌باشد. (b) یک ذره LDL که قرارگیری آپو B-100 در لایه قشری این ذره را نشان می‌دهد.

ریشه‌ها یک لبه قطبی ایجاد می‌کنند که به سرهای قطبی فسفولیپیدها و محیط آبی می‌پیوندند. سمت مخالف مارپیچ‌ها زنجیرهای جانبی آبگریز دارند که به‌سمت هسته غیرقطبی ذره لیپوپروتئینی می‌باشد. ساختمان مارپیچی α قسمتی از آپو C−I در شکل ۴۸-۳ نشان داده شده است. آپو B حاوی قطعات مارپیچ α و رشته β است. یک پلی‌پپتید بلند آپو B−۱۰۰ محیط ذره LDL را همانند یک کمربند احاطه می‌کند و بدین ترتیب بارها وارد لایه خارجی فسفولیپیدی شده و از آن خارج می‌گردد.

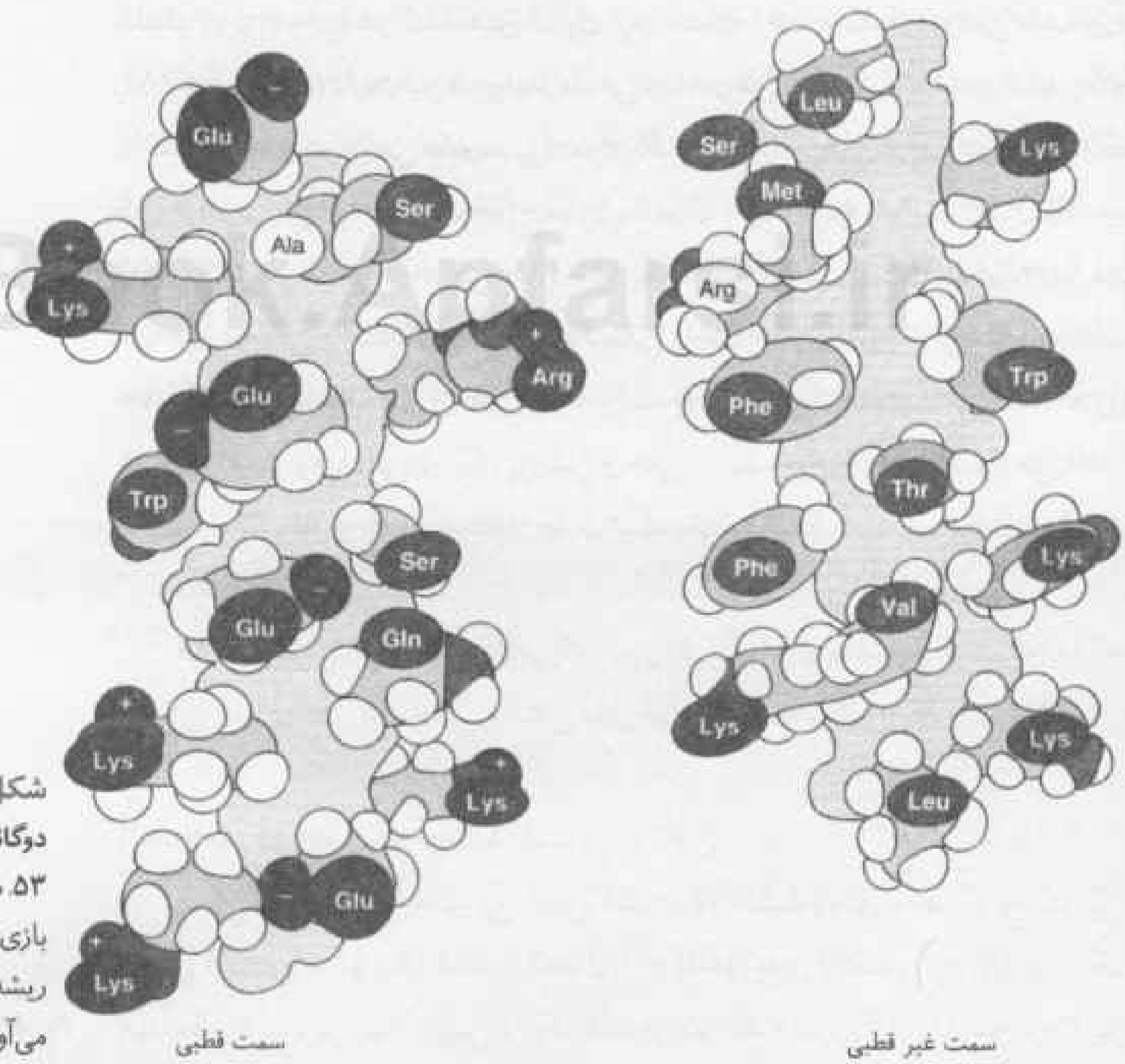
گلیکوپروتئین‌ها حاوی کربوهیدرات‌هایی با اتصال کووالان هستند

گلیکوپروتئین‌ها یک یا چند اسید آمینه با اتصال کووالان به ملکول‌های کربوهیدراتی (قندی) دارند. گلیکوپروتئین‌ها در بسیاری از فعالیت‌های طبیعی و مرتبط با بیماری که مسائل

جدول ۱۵-۳ • ترکیب شیمیایی کلاس‌های لیپوپروتئینی پلاسما

Total Lipoprotein Class	Total Protein (%)	Lipid (%)	درصد ترکیب اجزاء لیپیدی			
			Phospholipids	*Esterified Cholesterol*	*Uneserified Cholesterol*	*Triacylglycerols*
HDL_2[1]	۴۰–۴۵	۵۵	۳۵	۱۲	۴	۵
HDL_3[1]	۵۰–۵۵	۵۰	۲۰–۲۵	۱۲	۳–۴	۳
LDL	۲۰–۲۵	۷۵–۸۰	۱۵–۲۰	۳۵–۴۰	۷–۱۰	۷–۱۰
IDL	۱۵–۲۰	۸۰–۸۵	۲۲	۲۲	۸	۳۰
VLDL	۵–۱۰	۹۰–۹۵	۱۵–۲۰	۱۰–۱۵	۵–۱۰	۵۰–۶۵
Chylomicrons	۱٫۵–۲٫۵	۹۷–۹۹	۷–۹	۳–۵	۱–۳	۸۴–۸۹

[1] به زیرکلاس HDL



شکل ۴۸-۳ زنجیرهای جانبی یک قطعه مارپیچی دوگانه دوست آپولیپوپروتئین C-1 بین ریشه‌های ۳۲ و ۵۳. سمت قطبی ریشه‌های اسیدی را در مرکز و ریشه‌های بازی را در لبه نشان می‌دهد. در سمت دیگر مارپیچ، ریشه‌های آبگریز یک سمت غیرقطبی طولی را به وجود می‌آورند.

بـالینی را به همراه دارند، همکـاری می‌کنند. شناخته‌شده‌تـرین گلیکوپروتئین‌ها آنهایی هستند که در سطح خارجی غشاءهای پلاسمایی، ماتریکس خارج‌سلولی، و پلاسمای خون وجود دارند. انواع موجود در غشاءهای پلاسمایی اطلاعاتی را در خصوص شناسایی

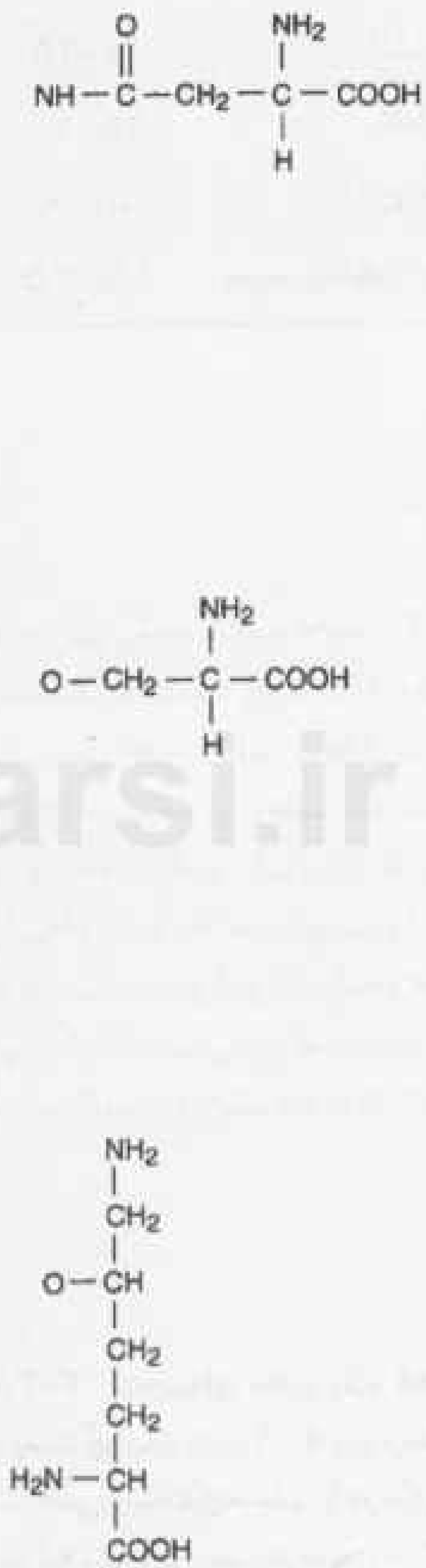
سلول‌ها توسط سلول‌های دیگر به‌منظور تنظیم رشد از طریق مهار تماسی فراهم می‌آورند. این گلیکوپروتئین‌ها همچنین شاخص‌های آنتی‌ژنیکی را برای سیستم‌های گروه خونی مختلف (برای مثال، ABO و Rh) در سطح گلبول‌های قرمز، سازگاری نسجی پیوندهای بافتی، و سایر گیرنده‌های سلولی برای هورمون‌ها، نوروترانسمیترها و ویروس‌ها به‌وجود می‌آورند. تومورزایی و ترانسفورماسیون بدخیمی با تغییراتی در ترکیب گلیکوپروتئینی غشاءهای پلاسمایی همراه هستند. در ماتریکس خارج سلولی، بسیاری از پروتئین‌ها (برای مثال، کلاژن و لامینین) و همچنین پروتئین‌های موجود در ترشحات موکوسی که سبب روانسازی و حفاظت سطوح می‌شوند، حاوی کربوهیدرات‌ها هستند. پروتئین‌های پلاسمایی اصلی شامل پروتئین‌های انعقاد خون، ایمونوگلبولین‌ها، پروتئین‌های کمپلمان، و هورمون محرک فولیکولی، هورمون تولیدکننده جسم زرد و هورمون محرک تیروئید (ولی نه آلبومین)، ساختمان گلیکوپروتئینی دارند.

میزان کربوهیدرات موجود در گلیکوپروتئین‌ها متغیر است؛ IgG از نظر وزنی ۴٪، گلیکوفورین موجود در غشاءهای گلبول قرمز انسان ۶۰٪، و گلیکوپروتئین معده‌ای انسان ۸۲٪ کربوهیدرات دارند. این کربوهیدرات می‌تواند در طول زنجیر پلی‌پپتیدی انتشار یکنواختی داشته باشد و یا در نواحی مشخصی متمرکز باشد. در پروتئین‌های موجود در غشاء پلاسمایی، کربوهیدرات تنها به قسمت خارج‌سلولی اتصال دارد. کربوهیدرات اتصال‌یافته معمولاً حاوی کمتر از ۱۵ و در برخی موارد تنها یک ریشه قندی است. گلیکوپروتئین‌هایی از گونه‌های حیوانی مختلف که عملکرد یکسانی دارند، اغلب حاوی توالی‌های اسید آمینه‌ای هُمولوگوس می‌باشند، ولی از نظر کربوهیدرات خود با یکدیگر متفاوت می‌باشند. هتروژنیتی در محتوای کربوهیدراتی در یک پروتئین و حتی در یک موجود زنده معمول می‌باشد. برای مثال، اشکال A و B ریبونوکلئاز پانکراتیک، توالی اسید آمینه‌ای یکسان ولی ترکیب کربوهیدراتی متفاوتی دارند.

قرارگیری کربوهیدرات در هنگامی که زنجیر پلی‌پپتیدی در حال عبور از شبکه آندوپلاسمی و گلژی است، طی یک سری واکنش‌های آنزیمی به انجام می‌رسد (ص. ۲۴).

اتصالات کووالان کربوهیدرات-پروتئین

دو اتصال کربوهیدراتی معمولی شامل **اتصال N-گلیکوزیدی** (اتصال نوع I) بین گروه آمیدی آسپاراژین و یک قند، و **اتصال O-گلیکوزیدی** (اتصال نوع II) بین یک گروه هیدروکسیل سرین یا ترئونین و یک قند می‌باشند (شکل ۴۹-۳). در نوع I پیوند به آسپاراژین در داخل توالی Asn-X-Thr(ser) می‌باشد. گلیکوپروتئین‌های پستانداران همچنین حاوی پیوندهای O-گلیکوزیدی به ۵-هیدروکسی‌لیزین (اتصال نوع III) هستند. این نوع پیوند در کلاژن‌ها و در پروتئین کمپلمان سرمی C1q یافت می‌شود. در موارد کمتر، اتصال به گروه هیدروکسیل ۴-هیدرکسی‌پرولین (اتصال نوع IV)، به یک تیول



شکل ۴۹-۳ مثال‌هایی از اتصالات گلیکوزیدی به اسیدهای آمینه موجود در پروتئین‌ها. نوع I یک اتصال N-گلیکوزیدی از طریق نیتروژن آمیدی یک Asn، نوع II یک اتصال O-گلیکوزیدی از طریق گروه هیدروکسیل Ser یا Thr، و نوع III یک اتصال O-گلیکوزیدی از طریق گروه ۵-هیدروکسیل در ۵-هیدروکسی‌لیزین است.

سیستئین (اتصال نوع V)، و به یک گروه α–آمینو یک زنجیر پلی‌پپتیدی (اتصال نوع VI) می‌باشد. غلظت‌های بالای اتصالات نوع VI به‌طریق غیرآنزیمی بین هموگلوبین و گلوکز خون در دیابت کنترل‌نشده تشکیل می‌شود. از آزمایش هموگلوبین گلیکوزیله برای پیگیری تغییرات غلظت گلوکز خون استفاده می‌شود (ارتباط بالینی ۵–۳).

۳–۷ • تاشدن پروتئین‌ها از ساختمان‌های تصادفی تا بی‌همتا: پایداری پروتئین

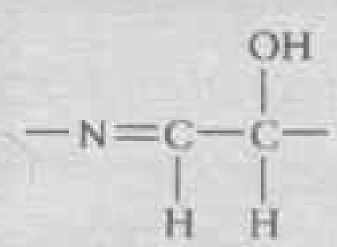
مشکل تاشدن پروتئین

توانایی یک ساختمان اول پروتئینی در تاشدن خودبه‌خودی به کونفورماسیون دوم یا سوم بومی خود، با استفاده از تنها اطلاعات مربوط به توالی اسید آمینه‌ای و نیروهای غیرکووالان مؤثر بر این توالی، برای تعداد زیادی از پروتئین‌ها نشان داده شده است. بر همین اساس، ریبونوکلئاز پانکراتیک بعد از دناتوره‌شدن و احیاء پیوندهای دی‌سولفیدی آن بدون هیدرولیز پیوندهای پپتیدی، به‌طور خود به خودی دوباره به کونفورماسیون بومی خود تا می‌شود. این نوع مشاهدات منجر به طرح این فرضیه شد که یک توالی پلی‌پپتیدی اطلاعاتی در خصوص تاشدن خود به خودی به کونفورماسیون فعال بی‌همتای خود، تحت شریط مناسب محلول و وجود گروه‌های پروستتیکی که ممکن است قسمتی از ساختمان باشد، را دارد. همان‌طور که در ادامه شرح داده خواهد شد، پروتئین‌های چاپرونی ممکن است تاشدن پروتئینی را تسهیل کنند. ساختمان‌های چهارم نیز بعد از تشکیل ساختمان سوم زیرواحدها، به‌طور خود به خودی همایش می‌یابند.

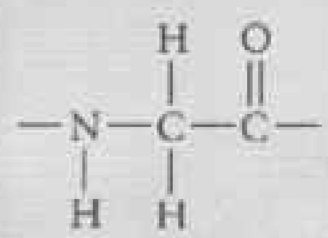
ارتباط بالینی ۵–۳

هموگلوبین گلیکوزیله، HbA_{1C}

یک هموگلوبین گلیکوزیله که به‌صورت HbA_{1C} مشخص می‌گردد، به طریق غیرآنزیمی در گلبول‌های قرمز خون به‌دلیل ترکیب گروه‌های آمینوی انتهای آمینوی زنجیر β هموگلوبین با گلوکز تولید می‌شود. ابتدا شکل آلدئیدی گلوکز با گروه آمینوی انتهای آمینو تولید یک شیف باز می‌کند،



که در ادامه به‌واسطه یک واکنش خودبه‌خودی، به‌نام نوآرایی آمادوری، به یک اتصال آمینو کتون پایدارتر نوآرایی می‌شود، غلظت HbA_{1C}



بستگی به غلظت گلوکز در خون و مدت هیپرگلیسمی دارد. در هیپر-گلیسمی طولانی‌مدت، غلظت HbA_{1C} ممکن است تا ۱۲٪ هموگلوبین کل یا بیشتر افزایش یابد. مبتلایان به دیابت قندی غلظت گلوکز خون بالایی دارند و به‌همین دلیل میزان HbA_{1C} آنها نیز بالا می‌باشد. از تغییرات غلظت HbA_{1C} در بیماران دیابتی می‌توان برای پیگیری تأثیر درمان افراد دیابتی استفاده نمود.

علی‌رغم تمامی کونفورماسیون‌های چرخشی احتمالی در اطراف پیوندهای یگانه موجود در ساختمان اول، ممکن است تعجب‌برانگیز به‌نظر برسد که یک زنجیر پلی‌پپتیدی به یک کونفورماسیون بی‌همتا تا می‌شود. برای مثال، زنجیر α هموگلوبین ۱۴۱ اسید آمینه دارد که هر کدام از آنها دارای حداقل چهار پیوند یگانه می‌باشد که امکان چرخش[1] آزاد حول آن وجود دارد. در صورتی که هر پیوندی که حول آن چرخش آزاد وجود دارد، برای آن دو یا چند کونفورماسونی روتامری[2] قابل‌دسترسی باشد، آنگاه حداقل 4^{141} یا 5×10^{84} کونفورماسیون احتمالی برای هر زنجیر پلی‌پپتیدی α وجود خواهد داشت.

کونفورماسیون یک پروتئین شکلی است که در یک قالب زمانی فیزیولوژیک، توالی آن کمترین انرژی آزاد گیبس قابل‌دسترسی را داشته باشد. لذا تاشدن تحت هر دو نوع کنترل ترمودینامیکی و کینتیکی قرار دارد. در حالی‌که هم اکنون جزئیات دانش تاشدن از ابتدای[3] یک پلی‌پپتید تنها برای چند نمونه متصور می‌باشد، با این وجود نقش برخی فرایندها در اکثر واکنش‌های تاشدن منطقی به‌نظر می‌رسد. شواهدی نشان می‌دهند که تاشدن توسط تعاملات غیرکووالان دامنه-کوتاه بین یک زنجیر جانبی و نزدیکترین همسایگان آن آغاز می‌شود که ساختمان‌های دوم را در نواحی کوچکی از پلی‌پپتید به‌وجود می‌آورند. زنجیرهای جانبی خاصی تمایلاتی برای تسریع تولید مارپیچ‌های α، رشته‌های β و پیچ‌ها یا خم‌های تیز (پیچ‌های β) در پلی‌پپتید دارند. این نواحی پلی‌پپتیدی که **جایگاه‌های شروع**[4] نامیده می‌شوند، به‌طور خود به‌خودی یک ساختمان دوم را اتخاذ می‌کنند. سپس ساختمان‌هایی که به‌طور نسبی تا شده‌اند، با یکدیگر تعامل نموده تا تولید وضعیت **گلبول-گداخته**[5] شود. این وضعیت یک ترکیب حدواسط متراکم‌شده در مسیر تاشدن می‌باشد که بیشتر عناصر ساختمان دوم کونفورماسیون بومی، ولی به همراه تعداد زیادی از تعاملات ساختمان سوم غلط، را دارد. نواحی از ساختمان دوم در وضعیت گلبول-گداخته، در مقایسه با نواحی دیگر، از تحرک بیشتری برخوردار هستند و گلبول گداخته در یک تعادل سریع با حالت کاملاً تانشده قرار دارد. تعاملات دامنه-متوسط و دامنه-بلند بین جایگاه‌های شروع مختلف با نوآرایی‌هایی در داخل این گلبول گداخته یافت می‌شوند و کونفورماسیون بومی دارای انرژی آزاد پایین زنجیر پلی‌پپتیدی تولید می‌شود. در ادامه پیوندهای دی‌سولفیدی (سیستینی) به‌وجود می‌آیند. مرحله محدودکننده-سرعت تاشدن و بازشدن کونفورماسیون بومی بین گلبول گداخته و ساختمان بومی قرار دارد. در مورد برخی پروتئین‌ها ممکن است دو یا چند کونفورماسیون تاشده با انرژی آزاد گیبس پایین وجود داشته باشد که از نظر ترمودینامیکی پایدار است. ارتباط بالینی ۶-۳ به بحث پیرامون تاشدن پروتئین و عوامل عفونی پرایونی می‌پردازد.

1. Rotation 2. Rotamer conformation 3. De novo 4. Initiation sites 5. Molten-globule

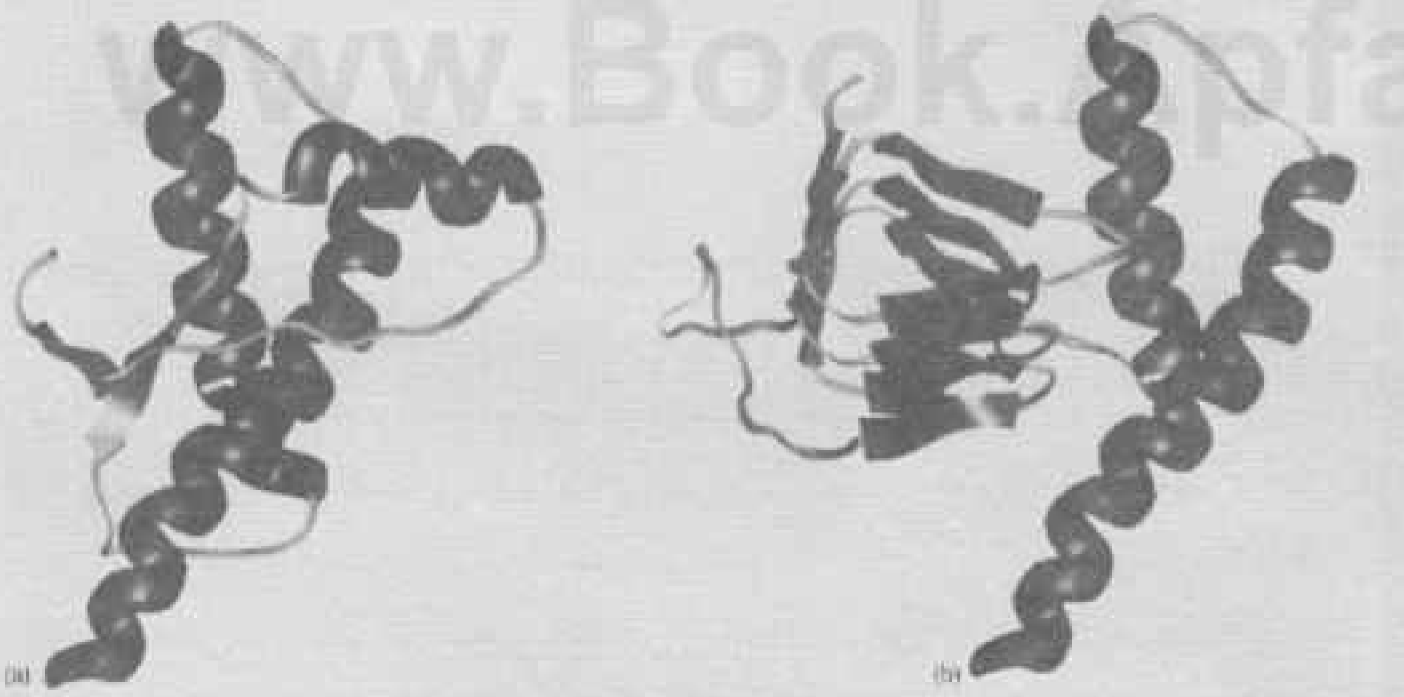
ارتباط بالینی ۶-۳

بیماری‌های پرایونی و پروتئین‌ها به‌عنوان عوامل عفونی: آنسفالیت‌های اسفنجی‌شکل قابل انتقال (TSEs)

پروتئین‌های پرایونی قادرند در غیاب DNA یا RNA به‌عنوان عوامل عفونی عمل کنند. بیماری پرایونی همچنین می‌تواند به‌صورت خودبه‌خودی (تک‌گیر) یا به واسطه وارثت یک ژن پروتئین پرایونی جهش‌یافته به‌وجود آید. این بیماری با آتاکسی (عدم هماهنگی عضلانی)، زوال عقلی، پارالیزی (فلج) مشخص می‌شود و تقریباً همیشه کشنده است. بررسی پاتوفیزیولوژیکی مغز، وجود پلاک‌های آمیلوئیدی و دژنراسیون اسفنجی‌شکل (واکوئلی) را نشان می‌دهد.

در بیماری پرایونی، PrP^c اشاره به کونفورماسیون سلولی شدیداً محلول پروتئین پرایونی، و PrP^{sc} به کونفورماسیون نامحلول سمی دارد که برای اولین بار از گوسفند مبتلا به بیماری اسکراپی (Sc) جدا شد. پروتئین PrP^c حاوی سه قطعه مارپیچی α و دو قطعه رشته β کوچک است. (شکل ۱ ارتباط بالینی).

تبدیل به شکل PrP^{Sc} سمی، با تبدیل یک قطعه مارپیچی α به یک رشته β همراه با القاء احتمالی ایجاد رشته‌های β در انتهای آمینوی زنجیر پلی‌پپتیدی مشخص می‌گردد که قبلاً ساختمان مشخصی نداشته است (شکل ۱ ارتباط بالینی). کونفورماسیون PrP^{Sc} سبب می‌شود تا سایر ملکول‌های PrP^c پرایونی به کونفورماسیون PrP^{Sc} تبدیل شده و، از طریق تعاملات رشته β بین ملکول‌های PrP^{Sc}، به‌صورت فیبرهای آمیلوئیدی پلیمریزه شوند. تولید پلیمر آمیلوئیدی غیرقابل‌برگشت است و در مغز سبب مرگ سلولی عصبی می‌شود. در چند بیماری نورودژنراتیو دیگر، تعادلات کونفورماسیونی مشابهی بین یک کونفورماسیون پروتئینی غالباً مارپیچی α محلول و یک کونفورماسیون حاوی رشته β کمتر محلول پروتئین وجود دارد که در آن پروتئین‌های کونفورماسیون رشته β به‌صورت فیبریل‌های آمیلوئیدی نامحلول پلیمریزه می‌شوند (شکل ۲ ارتباط بالینی). واحد پروتئینی برحسب نوع بیماری متفاوت است، ولی پلاک تولیدی ساختمان فیبریل آمیلوئیدی مشابه دارد (شکل ۲ ارتباط بالینی). بیماری‌های عصبی که غالباً توسط آمیلوئید القا می‌شوند، شامل آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون، و اسکلروز طرفی آمیوتروفیک (ALS، Lou Gehrig) می‌باشند.

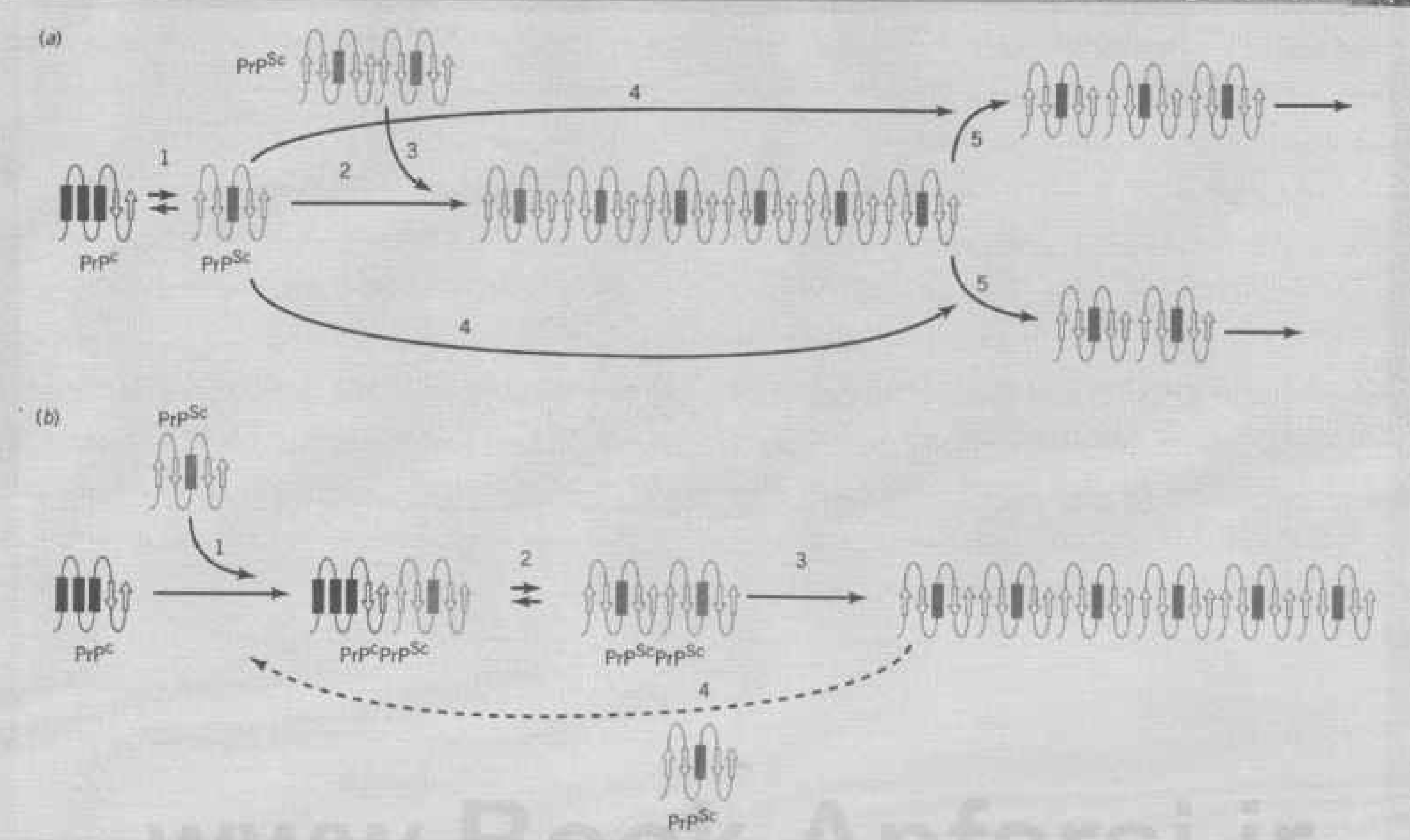


شکل ۱ ارتباط بالینی. ساختمان اشکال پرایونی. (a) ساختمان فولد $PrP(PrP^c)$. حدود ۱۲۰ ریشه اسید آمینه در انتهای آمینو مشاهده نمی‌گردند. (b) مدل ساختمان فولد PrP سمی (PrP^{Sc}) که در آن یک قطعه مارپیچی $-\alpha$ از کونفورماسیون (PrP^c) تولید یک رشته $-\beta$ می‌کند و حالا همچنین رشته‌های $-\beta$ از ناحیه قوس ساختمان PrP^{sc} و انتهای آمینوی قطعه زنجیر پلی‌پپتیدی تولید می‌شوند.



شکل ۲ ارتباط بالینی. میکروگراف الکترونی ساختمان فیبریل آمیلوئید حاصل از پلیمریزاسیون رشته β یک دومن SH3 از PI3 کیناز. فیبریل‌ها مشابه انواعی هستند که در بیماری‌های عصبی تولیدکننده آمیلوئید مشاهده می‌شوند. میله مقیاس برابر ۱۰۰ nm می‌باشد.

ارتباط بالینی ۶-۳ (ادامه)



شکل ۳ ارتباط بالینی. **مکانیسم‌های مربوط به تولید فیبر آمیلوئیدی که با PrP^{Sc} شروع می‌شود.**

پروتئین پرایونی یک گلیکوپروتئین حاوی ملکول‌های کربوهیدرات با اتصال کووالان و یک لیپید فسفاتیدیل اینوزیتول می‌باشد. این لیپید پروتئین پرایونی را به‌سمت خارج‌سلولی غشاء پلاسمایی متصل می‌کند. پروتئین این PrP^{Sc} موجود در غشاءپلاسمایی، همراه با پروتئین‌های گیرنده غشایی، در انتقال پیام‌های خارج‌سلولی به سلول عمل می‌کند.

بیماری پرایونی در انسان آثار فنوتیپی مختلفی را به وجود می‌آورد که در آن فنوتیپ وابسته به‌علت بیماری (تک‌گیر، قابل‌وراثت، یا عفونی) و نوع چندشکلی‌های موجود در ژن‌های پرایونی فرد می‌باشد. چندین چندشکلی ژن پرایونی در جمعیت انسانی با بیش از ۵۰ جهش گزارش‌شده وجود دارد. شروع تولید آمیلوئید توسط یک ملکول PrP^{Sc} «تخم» (شروع‌کننده) می‌تواند به سه طریق متفاوت باشد: (a) بیماری تک‌گیر با ترانسفورماسیون کونفورماسیونی شانسی خودبه‌خودی یک ملکول طبیعی PrP^{c} به‌کونفورماسیون PrP^{Sc} آغاز می‌شود، (b) پروتئین‌های PrP^{Sc} عفونی با خوردن گوشت آلوده به PrP^{Sc} یا ارائه PrP^{Sc} خارجی به طرق دیگر ارائه می‌شوند، و (c) وراثت یک ژن پرایونی جهش‌یافته با توانایی محصول ژنی در تاشدن بسیار ساده‌تر خودبه‌خودی به یک کونفورماسیون PrP^{Sc}. فنوتیپ‌های ارثی شامل سندروم گرتسمن-اشتراسلر-شینکر[1] و بی‌خوابی خانوادگی کشنده[2] می‌باشند. بیماری تک‌گیر منجر به بیماری کروتزفلد-ژاکوب[3] (CJD) می‌شود که معمولاً ظرف یکسال از شروع بیماری کشنده است. میزان بروز CJD یک مورد در هر یک میلیون در هر سال در سرتاسر جهان می‌باشد که به معنی سالانه حدود ۳۰۰ مورد در ایالات متحده است. بیماری تک‌گیر حدود ۸۵٪، اشکال ارثی حدود ۱۵٪ و بیماری عفونی کمتر از ۱٪ بیماری‌های پرایونی را شامل می‌شوند.

بیماری پرایونی حاصل از پروتئین PrP^{Sc} عفونی خارجی جالب‌ترین حالت است، زیرا توانایی یک پروتئین در عمل به‌عنوان یک عامل عفونی را در غیاب DNA یا RNA نشان می‌دهد. انسان می‌تواند از طریق خوردن

1. Gerstmann- Sträussler-Schienker syndrome
2. Fatal falmilial insomnia
3. Creutzfeldt-Jakob disease

ارتباط بالینی ۶-۳ (ادامه)

پرایون‌های گاوی کونفورماسیون PrP^{Sc} موجود در گوشت آلوده از گاو مبتلا به آنسفالیت اسفنجی‌شکل قابل انتقال[1] (BSE؛ بیماری جنون گاوی[2])، به بیماری پرایونی مبتلا شود. این بیماری، واریانت بیماری کروتز-ژاکوب (vCJD)، یک فنوتیپ متفاوت از CJD تک‌گیر کلاسیک دارد. سن میانه شروع برای vCJD برابر ۲۸ سال و برای CJD برابر ۶۸ سال می‌باشد. مدت بیماری برای vCJD حدود ۱۴ ماه و برای CJD حدود ۵ ماه است. مرکز کنترل بیماری‌ها (CDC) تعداد کل ۱۹۵ مورد vCJD را تا آگوست ۲۰۰۶ مورد شناسایی قرار داده است که ۱۶۲ مورد در انگلستان، ۲۰ مورد در فرانسه، و ۳ مورد در ایالات متحده بوده است. دوره کمون از زمان عفونت تا شروع بیماری حدود ۱۰ سال می‌باشد. به نظر می‌رسد عفونت حاصل از BSE انتخابی سن می‌باشد. از آنجایی‌که قله شیوع در انگلستان بین سال‌های ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۶ در بیمارانی با سن میانه ۲۸ رخ داد، این عفونت طی ۱۹۸۶-۱۹۸۴ در سن میانه ۱۸ سال برای افراد مبتلا رخ داده است.

راه مهم دوم ایجاد عفونت ناشی از کارهای پزشکی است. در سرتاسر جهان بین سال‌های ۱۹۸۵ و ۱۹۹۶ تعداد ۱۳۶ مورد vCJD در بیماران تحت درمان با هورمون رشد مشتق از هیپوفیز انسانی و ۱۳۶ مورد در بیماران دریافت‌کننده پیوندهای ماده خاکستری از فرد فوت‌شده گزارش شد. تعداد کمی از موارد پزشکی CJD با روش‌های دیگری نظیر پیوند قرنیه، انتقال خون، و درمان با گنادوتروپین انسانی به وجود آمده است. دو مکانیسم برای تولید پلاک آمیلوئیدی مطرح شده است که توسط یک پرایون عفونی آغاز می‌شود (شکل ۳ ارتباط بالینی). در مکانیسم هسته‌سازی پلیمریزاسیون (*a*) PrP^c (سبز) در تعادل سریع با کونفورماسیون PrP^{Sc} (قهوه‌ای) قرار دارد (مرحله ۱)، ولی پلیمریزاسیون (مرحله ۲) به یک فیبر آمیلوئیدی، در غیاب یک ملکول شروع‌کننده، آهسته است. ارائه یک پرایون عفونی PrP^{Sc} (نارنجی)، هسته فرایند پلیمریزاسیون را فراهم می‌سازد (مرحله ۳). این فرایند توسط قطعاتی از پلیمر تازه تولید ازدیاد می‌یابد (مرحله ۵).

در مکانیسم با هدایت توسط الگو (*b*) پرایون، PrP^{Sc}، به‌عنوان الگویی برای تسریع تغییر در کونفورماسیون PrP^c داخلی به PrP^{Sc} عمل می‌کند (مراحل ۱ و ۲). بعد از تبدیل به PrP^{Sc}، PrP^{Sc} سریعاً به فیبریل‌های نامحلول پلیمریزه می‌شود.

1. Bovine transmissible spongiform encephalitis 2. Mad cow disease

پروتئین‌های چاپرونی به فرایند تاشدن پروتئین کمک می‌کنند

سلول‌ها حاوی پروتئین‌هایی هستند که تا شدن را تسهیل می‌کنند. اینها شامل پرولیل سیس-ترانس ایزمرازها، پروتئین دی‌سولفید ایزومرازها، و پروتئین‌های چاپرونی می‌باشند. **پرولیل سیس-ترانس ایزومرازها** پیوندهای پپتیدی سیس و ترانس مربوط به ریشه‌های پرولین را به یکدیگر تبدیل می‌کنند. نتیجه تولید کونفورماسیون پیوند پپتیدی مناسب پرولیل برای هر کدام از ریشه‌های پرولین می‌باشد که برای کونفورماسیون بومی مورد نیاز است. **پروتئین دی‌سولفید ایزومرازها** تجزیه تولید اتصالات سیستینی دی‌سولفیدی را کاتالیز می‌کنند و بدین ترتیب اتصالات غلط تثبیت نشده و آرایش صحیح اتصالات مربوط به کونفورماسیون بومی سریعاً حاصل می‌شود.

پروتئین‌های چاپرون[1] به‌عنوان **پروتئین‌های شوک حرارتی**[2] (hsp) کشف شدند که خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که سنتز آنها با افزایش درجه حرارت بیشتر می‌شود. چاپرون‌ها نتیجه نهایی فرایند تاشدن را تغییر نمی‌دهند ولی مانع ایجاد تجمعات پروتئینی قبل از تاشدن کامل شده و از تولید ترکیب واسط معیوب یا کم‌ثبات با انتهای مرده[3]

1. Chaperone proteins 2. Heat shock proteins 3. Dead-end

جلوگیری می‌کنند. چاپرون‌های خانواده ۷۰ kDa در هنگام سنتز پروتئین‌ها بر روی ریبوزوم به آنها اتصال یافته و سطوح آبگریزی را می‌پوشانند که به‌طورطبیعی در معرض حلال قرار دارند. بدین ترتیب از ایجاد تجمعات پروتئینی تا زمان سنتز کامل زنجیر و فراهم‌سازی امکان تاشدن، جلوگیری می‌کنند. با این وجود برخی پروتئین‌ها نمی‌توانند در حضور چاپرون‌های hsp70 فرایند تاشدن خود را تکمیل کنند و به خانواده hsp60 (GroEL در *Escherichia* coli) پروتئین‌های چاپرونی، تحت عنوان **چاپرونین‌ها**[1]، تحویل داده می‌شوند. چاپرونین‌ها ساختمان‌های چندزیرواحدی استوانه‌ای هستند که به پلی‌پپتیدهای تانشده در حالت گلبول-گداخته در نزدیکی حفره آبگریز مرکزی آنها اتصال می‌یابند. چاپرونین‌ها فعالیت ATPase دارند و با هیدرولیز ATP فرایند تاشدن را تسهیل می‌کنند. در شکل ۵۰-۳، تاشدن به‌واسطه چاپرونین hsp60 در *E.coli* نشان داده شده است. پروتئین‌های چاپرونی همچنین برای تاشدن مجدد پروتئین‌ها بعد از عبور آنها از عرض غشاءهای سلولی مورد نیاز هستند. یک سیستم از چاپرون‌ها انتقال پروتئین به داخل میتوکندری‌ها و به داخل و از میان شبکه آندوپلاسمی را تسهیل می‌کنند. پروتئین‌ها با کونفورماسیون تانشده از میان دولایه لیپیدی غشاءهای مربوط به میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی عبور می‌کنند و اغلب برای تسهیل تاشدن آنها در داخل این اندامک‌های داخل سلولی نیاز به چاپرون‌های موضعی می‌باشد.

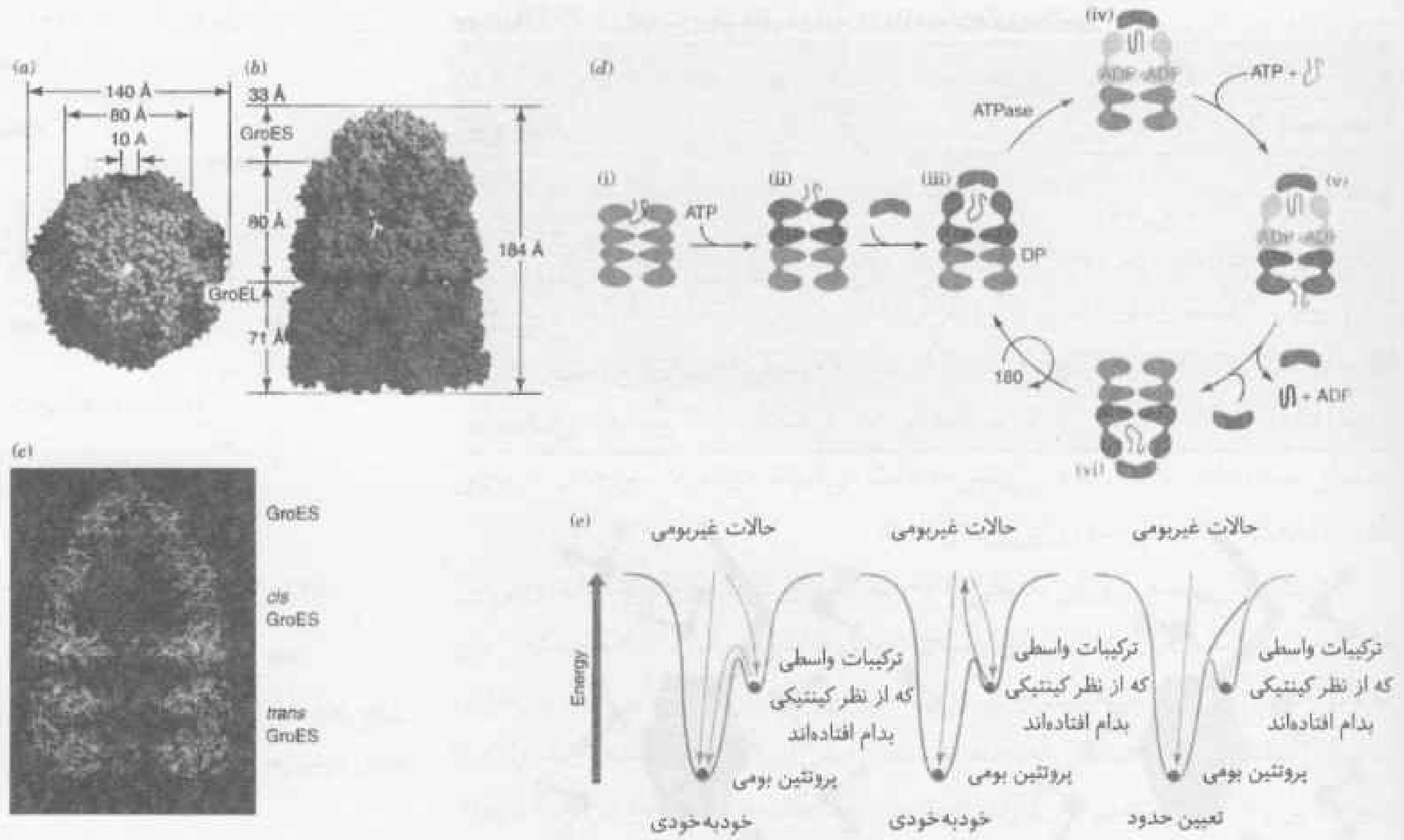
نیروهای غیرکووالان منجر به تاشدن شده و در پایداری پروتئینی همکاری می‌کنند

نیروهای غیرکووالان سبب می‌شوند تا یک پلی‌پپتید به یک کونفورماسیون بومی بی‌همتا تا شود و سپس ساختمان بومی را در برابر دناتوراسیون پایدار می‌کنند. نیروهای غیرکووالان نیروهای پیوندی ضعیف با قدرت ۴-۲۹ kJ/mol (۱-۷ kcal/mol) می‌باشند. این میزان را می‌توان با قدرت پیوندهای کووالان مقایسه نمود که حداقل ۲۱۰ kJ/mol (۵۰ kcal/mol) می‌باشد (جدول ۱۶-۳). با وجود این که تماس‌های غیرکووالان به تنهایی ضعیف هستند، ولی تعداد زیاد آنها در داخل یک پروتئین، انرژی زیادی را فراهم می‌سازد که تاشدن پروتئین را تسهیل می‌کند.

نیروهای تعامل آبگریز

نیروهای غیرکووالان مهمی که سبب می‌شوند تا یک پلی‌پپتید به کونفورماسیون بومی خود تا شود، **نیروهای تعامل آبگریز** هستند. قدرت اینها ناشی از هر دو نوع جاذبه بین گروه‌های قطبی نیست، بلکه به‌واسطه خصوصیات آب احاطه‌کننده گروه‌های غیرقطبی می‌باشد. یک زنجیر جانبی غیرقطبی یک ملکول پروتئین حل‌شده در آب سبب ایجاد یک قشر حلالیت[2] از آب می‌شود که در آن ملکول‌های آب شدیداً منظم هستند. وقتی دو زنجیر

1. Chaperonins 2. Solvation shell

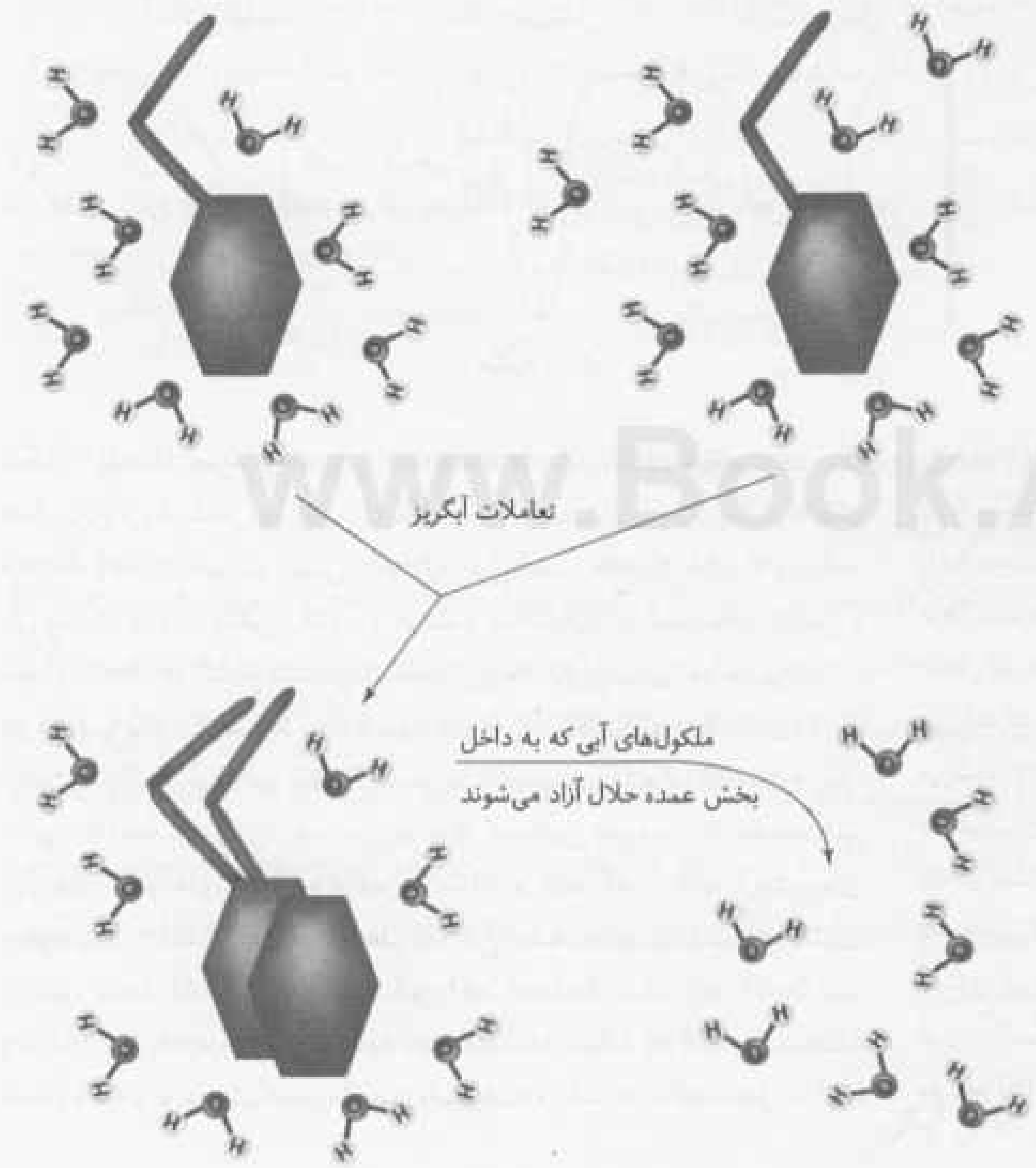


شکل ۳-۵۰ سیستم چاپرونین GroEL-GroES برای تاشدن پروتئین. (a) مدل فضا-پرکن کل کمپلکس چاپرونین در نگاه از بالا به‌سمت پایین از پروتئین کلاهک GroES. GroES به‌سمت سیس GroEL متصل است. GroES دارای ۷ زیرواحد پلی‌پپتیدی با وزن ملکولی ۱۰ kD است و ساختمان‌های استوانه‌ای ترانس و سیس GroEL هر کدام متشکل از هفت زیرواحد پلی‌پپتیدی (در مجموع ۱۴) هر کدام با ۶۰ kD هستند. (b) همانند (a) ولی از نگاه جانبی، با حلقه GroEL ترانس به رنگ قرمز، حلقه GroEL سیس به رنگ سبز، و کلاهک GroES به رنگ طلایی. (c) نمایش نواری یک برش از مرکز کمپلکس چاپرونین که حفره داخلی برش‌های استوانه‌ای سیس و ترانس را نشان می‌دهد که در آنجا پروتئین‌های دناتوره وارد و تاشدن آنها رخ می‌دهد. (d) طرح ساده‌شده‌ای برای تسهیل تاشدن پروتئین توسط GroEL: (i) پروتئین دناتوره (خط انحناءدار سیاه) وارد GroEL شده و با تمایل بالا به حفره متصل می‌شود (خط انحناءدار سیاه). (ii) ATP به یک حلقه اتصال یافته و تولید یک کونفورماسیون تغییریافته می‌کند (iii) حلقه متصل به ATP به GroES اتصال یافته تا پروتئین دناتوره را در داخل حجره تاشدن مخفی کند و در اثر یک تغییر کونفورماسیونی وسیع در حلقه متصل به GroES، پروتئین دناتوره را به سمت کونفورماسیون غیرمؤثر باز آن می‌کشاند و سپس این پروتئین را به داخل حفره توسعه‌یافته آزاد می‌کند تا به‌طور خودبه‌خودی تا شود. (iv) پروتئین در داخل این حجره تا شده و ATP هیدرولیز می‌شود. (v) ATP به حلقه ترانس اتصال می‌یابد که GroES و پروتئین تاشده را آزاد می‌کند، و (vi) پروتئین جدیدی وارد می‌شود. (e) دیاگرام‌های مربوط به انرژی آزاد تاشدن پروتئین. چپ: تاشدن پروتئین در غیاب چاپرونین منجر به تولید ترکیب واسطی می‌شود که از نظر کینتیکی بدام افتاده است. وسط: در تاشدن چاپرونینی، کشاندن و آزادسازی طی توسعه حجره چاپرونینی (سردکردن) ترکیب واسط بدام‌افتاده را باز می‌کند و به آن شانس‌های دیگری می‌دهد تا بدون بدام‌افتادن تا شود. راست: به‌علاوه، حفره GroEL نمای انرژی را صاف می‌کند تا از تولید برخی ترکیباتی جلوگیری شود که از نظر کینتیکی به دام افتاده‌اند.

جانبی غیرقطبی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، ناحیه سطحی که در معرض حلال قرار دارد، کاهش یافته و برخی ملکول‌های آب شدیداً منظم موجود در قشر حلالیت، از توده حلال آزاد می‌شوند. در نتیجـه آنتروپـی (یعنی، بی‌نظمی خـالص ملکول‌های آب در سیستم) افزایش می‌یابد. این افزایش آنتروپی از نظر ترمودینامیکی مساعد است و نیروی پیشبرنده‌ای است که سبب می‌شود بخش‌های غیرقطبی در داخل حلال آبی در کنار یکدیگر قرار گیرند. به‌هم‌پیوستن دو زنجیر جانبی فنیل‌آلانین در آب همراه با یک تغییر انرژی آزاد مساعد

جدول ۱۶-۳ • قدرت پیوندهای موجود در ساختمان‌های پروتئینی

نوع پیوند	قدرت پیوند (kJmol⁻¹)	(kcalmol⁻¹)
کووالان	>۲۱۰	>۵۰
غیرکووالان	۲٫۵-۲۹	۰٫۶-۷
آبگریز (یعنی دو گروه زنجیر بنزوئیل فنیل‌آلانین)	۸-۱۳	۲-۳
هیدروژنی	۴-۲۹۰	۱-۷
یونی (محیط دی‌الکتریک پایین)	۴-۲۵	۱-۶
واندروالس	<۴	<۱

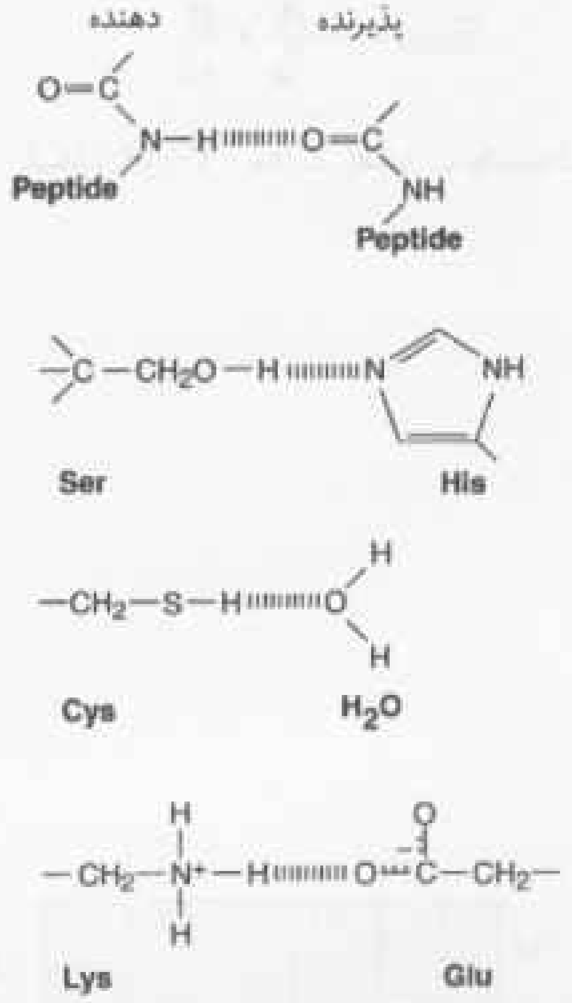


شکل ۵۱-۳ ایجاد تعاملات آبگریز بین دوگروه زنجیر جانبی فنیل‌آلانین.

۸ kJ/mol (۲ kcal/mol) می‌باشد که ناشی از این افزایش آنتروپی است (شکل ۵۱-۳).

طی تغییر از حالت تصادفی به کونفورماسیون دوم منظمی نظیر مارپیچ α یا ساختمان β، تقریباً یک سوم آب حلالیت در اطراف پلی‌پپتید تانشده آزاد و وارد توده حلال می‌شود. این تقریباً برابر ۲-۴ kJ/mol (۰٫۵-۰٫۹ kcal/mol) برای هر ریشه پپتیدی است. یک سوم دیگر قشر حلالیت ابتدایی زمانی ازدست می‌رود که یک پلی‌پپتید کونفورماسیون بومی

خود را به‌دست آورد. بدین‌ترتیب قطعات مختلف زنجیر پلی‌پپتیدی تاشده در مجاورت نزدیک قرار می‌گیرند که همراه با آزادسازی آب حلالیت موجود در بین این قطعات می‌باشد.



شکل ۵۲-۳ **برخی پیوندهای هیدروژنی معمولی که در داخل پروتئین‌ها یافت می‌شوند.**

پیوندهای هیدروژنی

پیوندهای هیدروژنی زمانی تشکیل می‌شوند که یک اتم هیدروژن به‌طور کووالان به یک اتم الکترونگاتیو اتصال داشته باشد و با اتم الکترونگاتیو دیگر به اشتراک گذاشته شود. اتمی که به آن اتم هیدروژن اتصال کووالان دارد را **اتم دهنده** هیدروژن و اتمی که اتم هیدروژن با آن به اشتراک گذاشته می‌شود را **اتم پذیرنده** گویند. در شکل ۵۲-۳ پیوندهای هیدروژنی معمولی نشان داده شده‌اند که در پروتئین‌ها یافت می‌شوند. کونفورماسیون‌های مارپیچی α و رشته β، پیوندهای هیدروژنی زیادی دارند.

قدرت یک پیوند هیدروژنی بستگی به فاصله اتم‌های دهنده و پذیرنده دارد. وقتی این فاصله بین ۲٫۷ تا ۳٫۷Å باشد، انرژی پیوندی زیادی حاصل می‌شود. با اهمیت کمتر ولی نه قابل‌چشم‌پوشی، هندسه پیوند نیز بر روی قدرت پیوند هیدروژنی تأثیر دارد. پیوندهای با انرژی بیشتر از نظر هندسی هم‌خط هستند که در آن اتمهای دهنده، هیدروژن، و پذیرنده در یک خط مستقیم قرار دارند. ثابت دی‌الکتریک محیط موجود در اطراف پیوند هیدروژنی نیز ممکن است در قدرت پیوند تأثیر داشته باشد. قدرت پیوندهای هیدروژنی معمول موجود در پروتئین‌ها ۴-۲۹ kJ/mol (۱-۷ kcal/mol) می‌باشد. با وجود این که پیوندهای هیدروژنی در تثبیت ترمودینامیکی یک کونفورماسیون پروتئینی همکاری دارند، ولی ممکن است تولید آنها نیروی پیشبرنده تاشدن نباشد. زیرا پیوندهای پپتیدی و سایر گروه‌های ایجادکننده پیوند هیدروژنی، در حالت دناتوره با آب ایجاد پیوند هیدروژنی می‌کنند و قبل از این که پلی‌پپتید بتواند تا شود، لازم است این پیوندها شکسته شوند. در محاسبه همکاری خالص نیروهای ایجادکننده پیوند هیدروژنی برای تاشدن، انرژی مورد نیاز برای شکستن پیوندهای هیدروژنی با آب می‌بایست از انرژی حاصل از تشکیل پیوندهای هیدروژنی جدید بین اتم‌ها در پروتئین تاشده کسر شود.

تعاملات الکترواستاتیک

تعاملات الکترواستاتیک (اتصالات یونی یا نمکی) بین گروه‌های باردار در تثبیت ساختمان پروتئین و اتصال لیگاندهای باردار و سوبستراها به پروتئین‌ها مهم هستند. برحسب این که بارهای تعامل‌کننده هم علامت یا با علامت‌های مخالف هستند، نیروهای الکترواستاتیک دافعه یا جاذبه می‌باشند. قدرت نیروی الکترواستاتیک (E_{el}) مستقیماً وابسته به بار (Z) هر یون بوده و ارتباط معکوس با ثابت دی‌الکتریک (D) حلال و فاصله بین بارها (r_{ab}) دارد (شکل ۵۳-۳).

$$E_{el} \approx \frac{Z_A \cdot Z_B \cdot \varepsilon^2}{D \cdot r_{ab}}$$

شکل ۵۳-۳ **قدرت تعاملات الکترواستاتیک.**

آب یک ثابت دی‌الکتریک بالا (D=۸۰) دارد، و تعامل بین بارها در آب نسبت به

$$E_{VDW} = -\frac{A}{r_{ab}^{6}} + \frac{B}{r_{ab}^{12}}$$

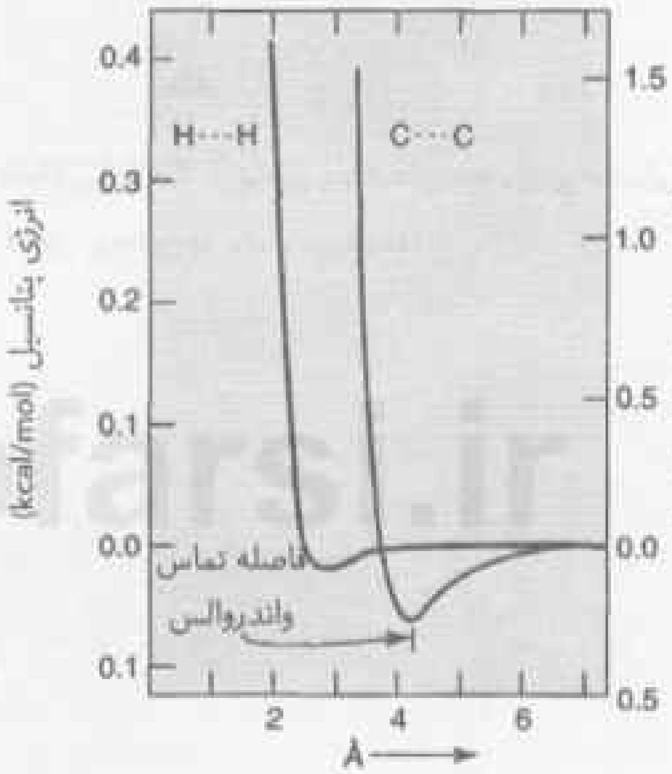
شکل ۵۴-۳ قدرت تعاملات واندروالس.

این تعاملات در داخل یک پروتئین که در آن ثابت دی‌الکتریک پایین است، ضعیف می‌باشد. هرچند، اکثر گروه‌های باردار در سطح باقی می‌مانند و در آنجا با گروه‌های باردار دیگر پروتئین به‌دلیل ثابت دی‌الکتریک بالای آب تعامل نمی‌کنند، ولی توسط پیوندهای هیدروژنی و تعاملات قطبی با آب تثبیت می‌شوند. این تعاملات نیروهای غالب برای قرار دادن بیشتر گروه‌های باردار یک پروتئین در خارج ساختمان‌های تاشده را فراهم می‌سازند.

نیروهای واندروالس

نیروهای واندروالس[1] ضعیف‌ترین نیروهای غیرکووالان هستند. این نیروها دو بخش جاذبه (A) و دافعه (B) دارند؛ جاذبه به‌طور معکوس با توان ششم فاصله بین دو اتم تعامل‌کننده (r_{ab}) و دافعه به‌طور معکوس با توان دوازدهم این فاصله ارتباط دارد (شکل ۵۴-۳). در فاصله مطلوب، میزان A مطابق با نیروی جاذبه کمتر از ۴ kJ/mol (۱ kcal/mol) در هر تعامل اتمی است که حاصل القاء تغییرات فضایی مکمل یا دوقطبی‌ها در چگالی الکترونی اتم‌های مجاور در هنگام رسیدن اربیتال‌های الکترونی دو اتم به کمترین فاصله می‌باشد. هرچند، وقتی اتم‌ها نزدیک‌تر می‌شوند، با شروع همپوشانی اربیتال‌های الکترونی اتم‌های مجاور، جزء دافعه (بخش B) نیروی واندروالس غالب می‌شود. به نیروی دافع اغلب **ممانعت فضایی**[2] گفته می‌شود.

حداکثر فاصله تعامل مساعد بین دو اتم را **فاصله تماسی واندروالس** گویند که برابر مجموع شعاع‌های واندروالس دو اتم می‌باشد (شکل ۵۵-۳). شعاع‌های واندروالس اتم‌هایی که در پروتئین‌ها یافت می‌شوند، در جدول ۱۷-۳ آورده شده‌اند.



شکل ۵۵-۳ انرژی‌های تعامل تفرق واندروالس-لندنی بین دو اتم هیدروژن و دو اتم کربن (چهاروجهی). انرژی‌های منفی مساعد هستند و انرژی‌های مثبت نامساعد می‌باشند.

نیروهای دافعه واندروالس بین اتم‌های یک پیوند پپتیدی در زوایای اختصاصی ϕ و ψ مربوط به کونفورماسیون‌های مارپیچ α و رشته β، در کمترین میزان می‌باشند. لذا عدم وجود یک نیروی دافعه واندروالس برای تولید ساختمان دوم در پروتئین‌ها اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. در هنگام کسب کونفورماسیون بومی، هزاران تعامل واندروالس ضعیف به وجود می‌آید. همکاری مجموع اینها نقش اساسی در پایداری یک ساختمان تاشده دارد.

یک نوع اختصاصی از تعامل (π-الکترون - π- الکترون) زمانی رخ می‌دهد که دو حلقه آروماتیک نزدیک یکدیگر شده و الکترون‌های موجود در حلقه‌های آروماتیک آنها به‌شکل مساعدی تعامل کنند (شکل ۵۶-۳). این تعامل می‌تواند منجر به نیروهای جاذبه تا ۲۵ kJ/mol (۶ kcal/mol) شود.



شکل ۵۶-۳ تعاملات π- الکترون - π- الکترون بین دو حلقه آروماتیک.

دناتوراسیون منجر به ازدست‌رفتن ساختمان بومی می‌شود

دناتوراسیون زمانی رخ می‌دهد که یک پروتئین ساختمان بومی دوم، سوم و یا چهارم خود را از دست بدهد. به دنبال دناتوراسیون کونفورماسیونی، پیوندهای پپتیدی شکسته نمی‌شوند.

1. van der Waals 2. Steric hinderance

جدول ۱۷-۳ . شعاع‌های پیوند کووالان و شعاع‌های واندروالس برای اتم های انتخابی (Å)

اتم	شعاع کووالان (Å)	شعاع واندروالس (Å)[1]
کربن (چهاروجهی)	۰٫۷۷	۲٫۰
کربن (آروماتیک)	۰٫۶۹ طول پیوند دوگانه	۱٫۷۰
	۰٫۷۳ طول پیوند یگانه	
کربن (آمید)	۰٫۷۲ به N آمیدی	۱٫۵۰
	۰٫۶۷ به اکسیژن	
	۰٫۷۵ به C زنجیر	
هیدروژن	۰٫۳۳	۱٫۰
اکسیژن (—O—)	۰٫۶۶	۱٫۳۵
اکسیژن (O=)	۰٫۵۷	۱٫۳۵
نیتروژن (آمید)	۰٫۶۰ به C آمید	۱٫۴۵
	۰٫۷۰ به H پیوند هیدروژنی	
	۰٫۷۰ با C زنجیر	
سولفور، مورب	۱٫۰۴	۱٫۷۰

[1] فاصله تماس واندروالس مجموع دو شعاع واندروالس برای دو اتم مجاور است.

حالت دناتوره همیشه با ازدست‌رفتن فعالیت پروتئین در ارتباط است. ازدست‌رفتن فعالیت لزوماً مترادف با دناتوراسیون نیست، زیرا تغییرات کونفورماسیونی کوچک نیز می‌توانند بدون از دست‌رفتن ساختمان بومی تاشده، منجر به از دست رفت فعالیت شوند. برای مثال، تغییر در موقعیت یک زنجیر جانبی یا پروتوناسیون یک زنجیر جانبی در جایگاه فعال یک آنزیم سبب ازبین رفتن فعالیت آن می‌شود، ولی کونفورماسیون بومی آن باقی می‌ماند.

با وجود این که تفاوت‌های کونفورماسیونی بین ساختمان‌های دناتوره و بومی ممکن است قابل‌توجه باشد، تفاوت انرژی آزاد بین این ساختمان‌ها معمولاً پایین و در حدود ۲۰-۴۰ kJ/mol (۵-۱۰ kcal/mol) (معادل انرژی سه یا چهار پیوند غیرکووالان) می‌باشد. لذا ازدست‌رفتن یک پیوند هیدروژنی یا جاذبه الکترواستاتیک یا آبگریز می‌تواند سبب ناپایداری یک ساختمان تاشده شود. این نوع تغییر در ناپایداری یک پیوند کووالان، به نوبه‌خود، می‌تواند به‌واسطه یک تغییر در pH، قدرت یونی یا درجه حرارت، رخ دهد. وجود گروه‌های پروستتیک، کوفاکتورها، و سوبستراها نیز بر روی پایداری کونفورماسیون طبیعی آن تأثیر دارند.

بیان این موضوع که شکستن یک پیوند غیرکووالان می‌تواند سبب دناتوراسیون شود، به شکل واضحی مغایر با این مشاهده است که یک توالی اسید آمینه‌ای اغلب می‌تواند بدون ازدست‌رفتن ساختمان پروتئین، به میزان قابل توجهی تغییر کند. کلید حل این تضاد واضح، کلمه «ضروری» است. بسیاری از تعاملات غیرکووالان برای پایداری ساختمانی



شکل ۵۷-۳ غلظت حالت- پایدار یک پروتئین حاصل سرعت‌های سنتز و تخریب آن است.

کونفورماسیون بومی یک پروتئین ضروری نیستند. در حالی‌که، جایگزینی یا تغییر یک اسید آمینه ضروری که یک تعامل غیرکووالان مهم بدون تعامل پایدارکننده جبرانی فراهم می‌کند، به میزان قابل‌توجهی بر روی پایداری یک کونفورماسیون بومی تأثیر می‌گذارد.

غلظت سلولی یک پروتئین تحت کنترل سرعت سنتز و تجزیه آن قرار دارد (شکل ۵۷-۳). تحت بسیاری از حالات، دناتوراسیون یک پروتئین مرحله کنترل‌کننده سرعت در تجزیه آن است. آنزیم‌های سلولی و اندامک‌هایی که پروتئین‌ها را تجزیه می‌کنند، پروتئین‌های دناتوره را «شناسایی نموده» و آنها را سریعاً حذف می‌کنند. در موارد تجربی، دناتوراسیون پروتئین می‌تواند با افزودن اوره، گوانیدین هیدروکلراید یا دترژنت‌ها (برای مثال، سدیم دودسیل سولفات) رخ دهد که پیوندهای آبگریز موجود در پروتئین‌ها را می‌شکنند و حالت دناتوره را پایدار می‌سازند. افزودن یک باز قوی، اسید، یا حلال آلی یا حرارت-دادن به بیش از $60^{\circ}C$ نیز راه‌های متداولی برای دناتوراسیون یک پروتئین هستند.

۸-۳ • جنبه‌های پویای ساختمان پروتئین

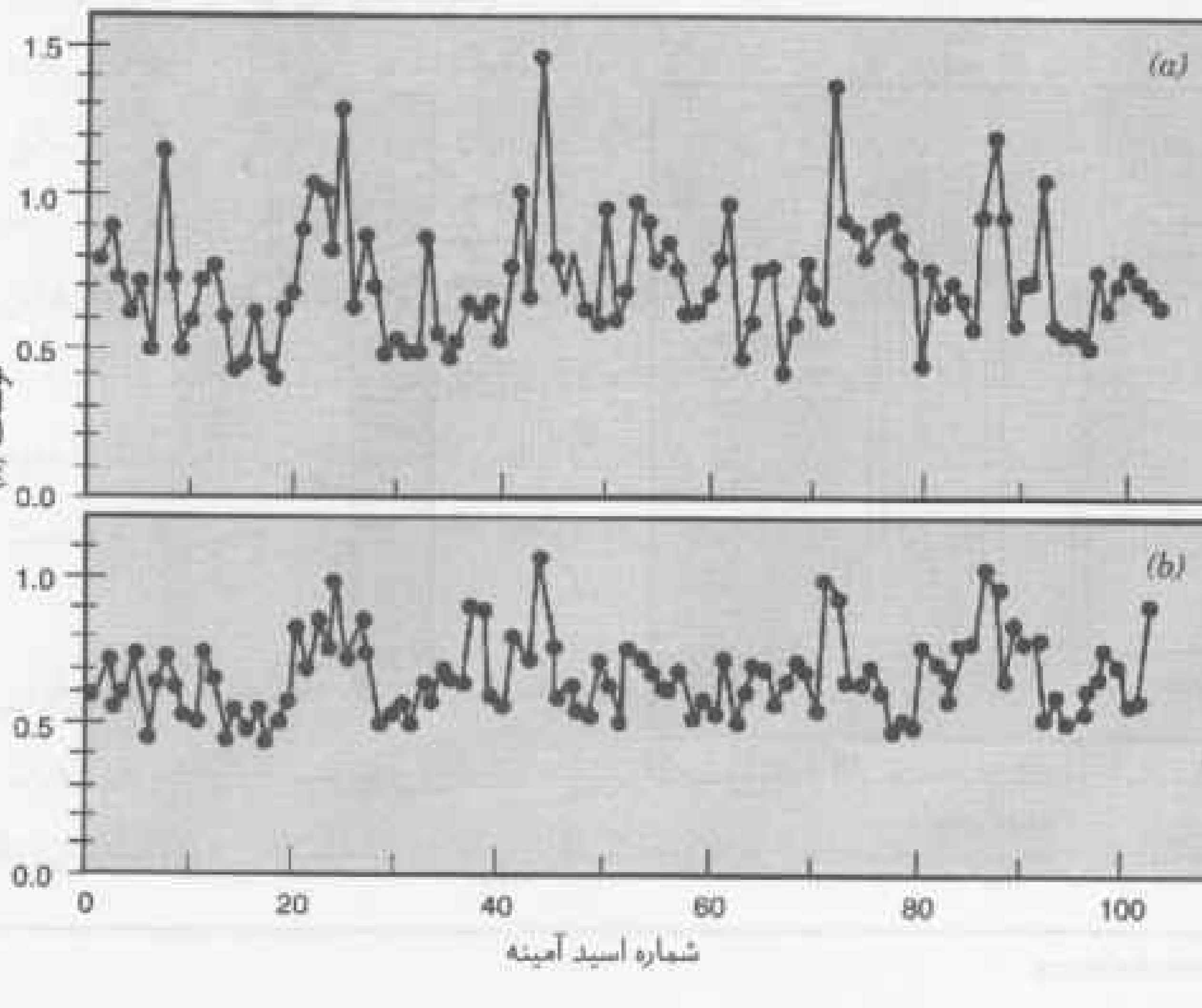
با وجود این که انکسار اشعه-X با قدرت تفکیک بالا، مختصات هر اتم موجود در پروتئین را نشان می‌دهد، شواهد تجربی حاصل از NMR، اسپکتروسکوپی فلورسانس، و وابستگی حرارتی انکسار اشعه-X نشان می‌دهند که اتم‌های موجود در یک ملکول پروتئین، یک حرکت پویای مایع-مانند دارند و در یک موقعیت ساکن نیستند. غیر از موقعیت دقیق، مختصات اتمی حاصل از انکسار اشعه-X، موقعیت متوسط-زمانی[1] هر اتم را نشان می‌دهد. زمان تعیین موقعیت متوسط[2]، مدت زمان جمع‌آوری داده‌ها است که ممکن است چند ساعت طول بکشد. لذا کونفورماسیون فعال ممکن است متفاوت از کونفورماسیون متوسط باشد. یک ساختمان اشعه-X همچنین نقص‌های کوچک در بسته‌بندی ساختمان تاشده را نشان می‌دهد، به‌طوری که سوراخ‌هایی را در این ساختمان نمایان می‌سازد که فضای پروتئینی را برای انعطاف‌پذیری فراهم می‌کند. این مفهوم که هر اتم موجود در یک موقعیت، همانند ملکول‌های موجود در داخل یک محلول، در حرکت ثابت قرار دارد، با وجود فشارهای حاصل از پیوندهای کووالان و ساختمان دوم و سوم آن، موضوع مهمی در ساختمان پروتئین است.

محاسبات تئوری **دینامیک ملکولی**، تغییر در مختصات اتم‌های موجود در یک ساختمان پروتئینی و در موقعیت نواحی ساختمانی ناشی از مجموع حرکات اتم‌ها در آن ناحیه را شرح می‌دهد. این محاسبه براساس حل معادله نیوتن حرکت خودبه‌خودی برای تمامی اتم‌های پروتئین و حلال در تعامل با آن است. تابع‌های انرژی که در این معادله مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل نمایش انرژی‌های پیوندی کووالان و غیرکووالان به‌واسطه نیروهای الکترواستاتیک، ایجاد پیوند هیدروژنی و نیروهای واندروالس می‌باشند. اتم‌های

1. Time-averaged 2. Time for position averaging

مجزا به‌طور تصادفی سرعتی از یک انتشار تئوری را دارند و از معادلات نیوتن برای شل نمودن سیستم در یک درجه حرارت خاص استفاده می‌شود. این محاسبه کار بسیار سنگینی است، حتی وقتی محدود به کمتر از چندصد پیکوثانیه (یک پیکوثانیه معادل 10^{-12} ثانیه) زمان دینامیک پروتئین می‌باشد. این محاسبات نشان می‌دهند که متوسط اتمی موجود در یک پروتئین، در یک مقیاس پیکوثانیه‌ای، در یک مسافت ۰٫۷ آنگسترومی در حال نوسان است. برخی اتم‌ها یـا گروه‌های اتمی مسافت‌های بیشتر یـا کمتری را نسبت به متوسط محاسبه‌شده طی می‌کنند (شکل ۵۸-۳).

حرکت خالص هر قطعه یک پلی‌پپتید در طی زمان، نمایشی از مجموع نیروهای ناشی از نوسانات اتمی سریع به همراه تکان‌های آهسته موضعی و حرکات ارتجاعی گروه‌های دارای اتصال کووالان است. این حرکات در قسمت درونی بسیار متراکم یک پروتئین گاهی این امکان را فراهم می‌سازد که حلقه‌های آروماتیک مسطح مدفون‌شده مربوط به ریشه‌های تیروزین تکان بخورند. این نوسانات کوچک سبب «روانی» حرکات بزرگ در پروتئین‌ها، مثل حرکات دومنی و تغییرات ساختمان چهارم، مثلا همانند مواردی که با اتصال O_2 به هموگلوبین رخ می‌دهد (ص ۴۸۷)، می‌شوند. رفتار پویـای پروتئین‌ها اساس تغییرات کونفورماسیونی است که با اتصال سوبسترا، مهارکننده، یا دارو به یک آنزیم و گیرنده رخ می‌دهند که منجر به تولید اثرات آلوستریک در هموگلوبین، انتقال الکترون در سیتوکروم‌ها و تشکیل همایش‌های سوپراملکولی نظیر ویروس‌ها می‌شوند. این حرکات همچنین ممکن است یک نقش وظیفه‌دار در فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌ها داشته باشند.



شکل ۵۸-۳ نوسانات ساختمان سیتوکروم c. (a) نوسانات محاسبه‌شده در یک مقیاس زمانی پیکوثانیه کربن‌های α در داخل هر ریشه اسید آمینه موجود در ساختمان تاشده سیتوکروم c. (b) نوسان هر کربن α ریشه‌های اسید آمینه که به شکل تجربی مشاهده می‌شود و از وابستگی حرارتی الگوی انکسار اشعه-X برای آن پروتئین تعیین شده است. سیتوکروم c ۱۰۳ ریشه اسید آمینه دارد. محور x نمودار مربوط به ریشه‌های اسید آمینه موجود در سیتوکروم c از ۱ تا ۱۰۳ و محور y نمودار مربوط به فواصل نوسانات برحسب آنگستروم است.

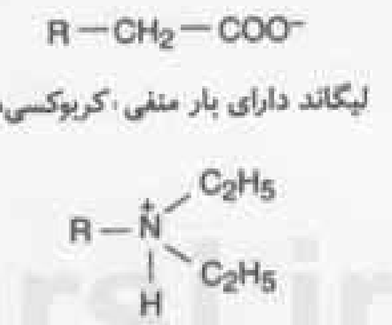
۳-۹ • شناسایی، تخلیص و تعیین ساختمان و سازماندهی پروتئین

جداسازی پروتئین‌ها براساس بار

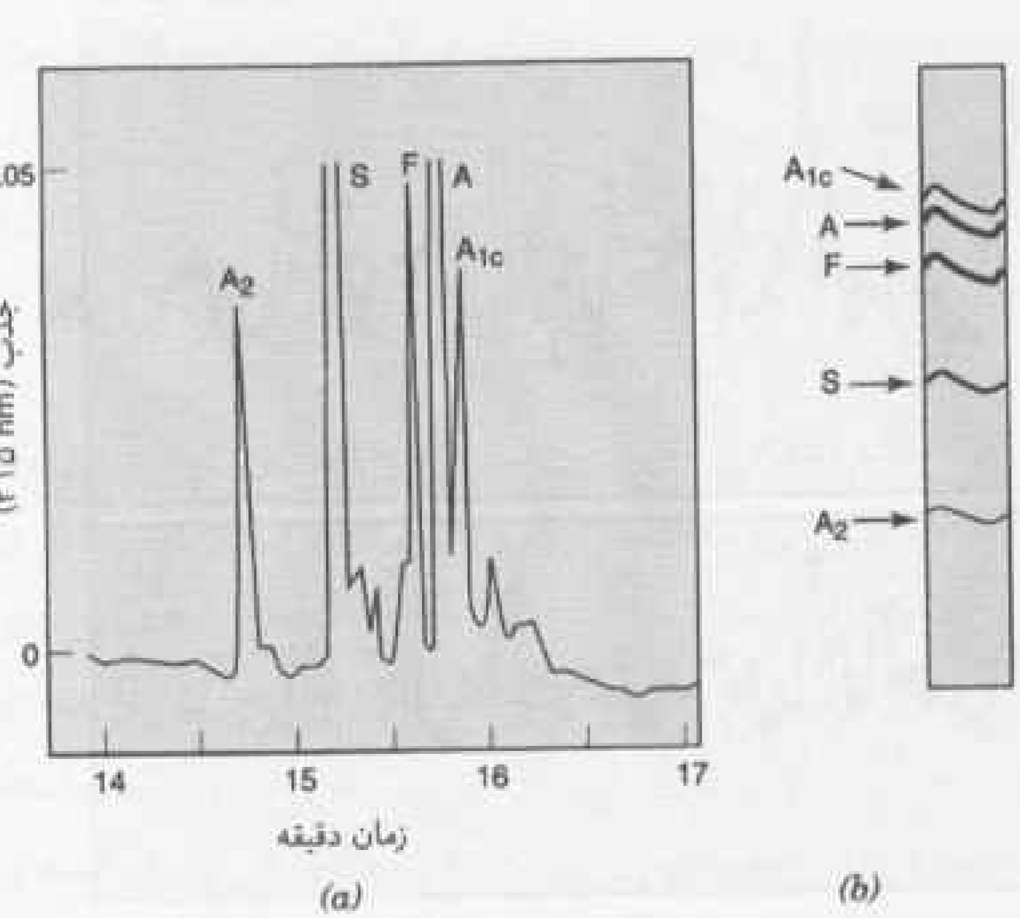
در **الکتروفورز**، پروتئین حل‌شده در یک محلول بافری در یک pH خاص در یک میدان الکتریکی قرار داده می‌شود. برحسب ارتباط pH بافر با pI پروتئین، پروتئین به‌سمت کاتد (−) یا آند (+) حرکت کرده و یا ساکن (pH=pI) باقی می‌ماند. محیط‌های پشتیبانی نظیر ژل‌های پلیمری و استات سلولز) مورد استفاده قرار می‌گیرند. محیط‌های خنثی با محلول بافری اشباع می‌شوند، یک نمونه پروتئینی بر روی این محیط به‌صورت یک خط یا نقطه قرار داده می‌شود، میدان الکتریکی در عرض محیط ایجاد می‌شود، و پروتئین‌های باردار به‌صورت نواحی در محیط به‌سمت قطب مناسب خود حرکت می‌کنند.

یکی از تکنیک‌های با قدرت تفکیک بالا، **تمرکز ایزوالکتریک**[1] است که در آن مخلوط آمفولیت‌های پلی‌آمینو-اسید پلی‌کربوکسیلیک دارای یک دامنه مشخص از مقادیر pI جهت ایجاد یک شیب pH در عرض میدان الکتریکی به‌کار رفته مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک پروتئین باردار در میان این شیب pH در میدان الکتریکی حرکت کرده تا به ناحیه‌ای از pH در شیب برسد که برابر میزان pI آن است. در این نقطه پروتئین ثابت شده و ممکن است قابل مشاهده باشد (شکل ۵۹-۳). پروتئین‌هایی که از نظر میزان pI خود به اندازه تنها ۰٫۰۰۲۵ با یکدیگر اختلاف دارند، به شکل مناسبی در این شیب pH جدا می‌گردند.

از کروماتوگرافی ستونی **تعویض یونی** برای جداسازی preparative پروتئین‌ها بر اساس بار استفاده می‌شود. رزین‌های تعویض-یونی حاوی مواد نامحلولی (آگارز، پلی‌آکریلامید، سلولز و شیشه) هستند که گروه‌های باردار دارند (شکل ۶۰-۳). رزین‌های با بار منفی به ملکول‌های دارای بار مثبت اتصال یافته و **رزین‌های تعویض-کاتیونی** هستند. رزین‌های



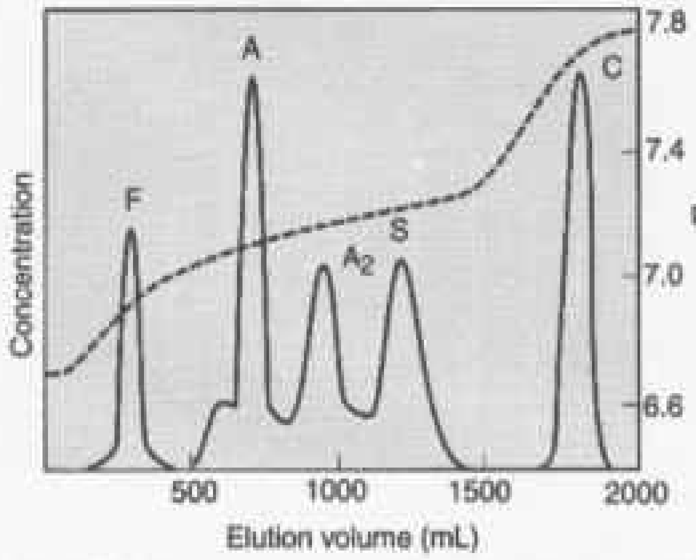
شکل ۶۰-۳ دو مثال از لیگاندهای باردار مورد استفاده در کروماتوگرافی تعویض یونی.



شکل ۵۹-۳ تمرکز ایزوالکتریک هموگلوبین‌های یک بیمار مبتلا به HbS و β- تالاسمی هتروزیگوس. این شکل جداسازی براساس تمرکز ایزوالکتریک HbA1c (HbA گلیکوزیله در انتهای آمینو، ارتباط بالینی ۵-۳ را ببینید)، HbA فرد بزرگسال طبیعی، HbF جنینی، HbS سلول داسی (ارتباط بالینی ۲-۶ را ببینید)، و HbA_2 جزئی بزرگسالان را نشان می‌دهد. (a) تمرکز ایزوالکتریک به‌طریق الکتروفورز موئینه‌ای با دامنه pH آمفولیت بین ۶٫۷ تا ۷٫۷ و جستجوی باندها در ۴۱۵ nm انجام شد. (b) تمرکز ایزوالکتریک بر روی ژل با Pharmacia Phast System انجام شد؛ دامنه pH آمفولیت بین ۶٫۷ و ۷٫۷ می‌باشد.

1. Isoelectric focusing

با بار مثبت قویاً به آنیون‌ها اتصال می‌یابند و **رزین‌های تعویض-آنیونی** هستند. شدت تأخیر خروج یک پروتئین (یا یک اسید آمینه) حاصل از رزین، بستگی به بزرگی بار پروتئین در pH خاص مورد آزمایش دارد. ملکول‌هایی که بار یکسان با رزین دارند، در ابتدا به صورت یک باند الوت می‌شوند. سپس آنهایی که بار مخالف با رزین دارند با ترتیبی خارج می‌گردند که وابسته به چگالی بار پروتئین می‌باشد (شکل ۶۱-۳). وقتی به‌دلیل قدرت تعامل جاذبه بین ملکول باندشده و رزین، برداشت یک ملکول از رزین مشکل است، از تغییر سیستماتیک در pH یا قدرت یونی برای تضعیف این تعامل استفاده می‌شود. برای مثال، یک افزایش شیب pH از طریق رزین تعویض-کاتیونی سبب کاهش تفاوت بین pH محلول و pI پروتئین اتصالی می‌شود. بدین‌ترتیب pH و pI سبب کاهش بزرگی بار خالص موجود بر روی پروتئین و کاهش قدرت تعامل باری بین پروتئین و رزین می‌شود. افزایش شیب قدرت یونی نیز سبب کاهش تعاملات باری می‌گردد، زیرا یون‌ها با پروتئین‌ها برای اتصال رقابت می‌کنند و الکترولیت‌های دارای اتصال کووالان را از رزین الوت می‌کنند.



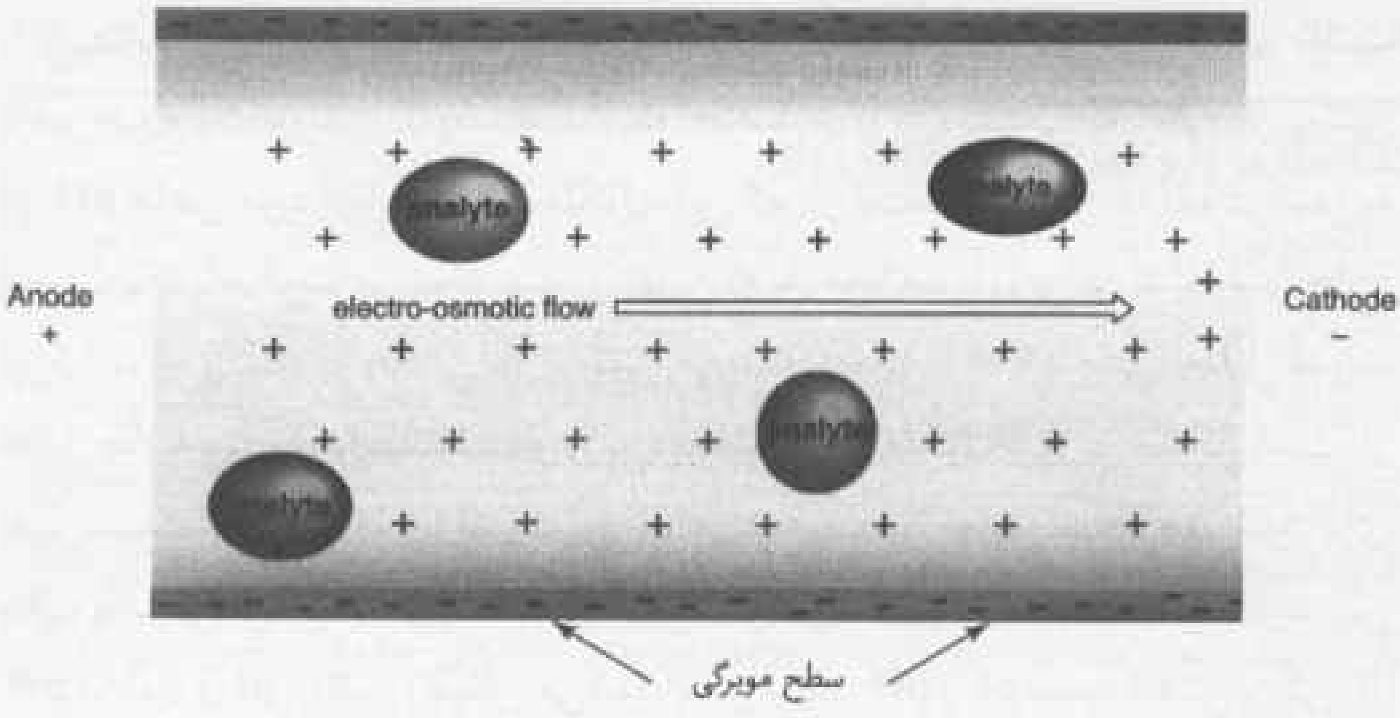
شکل ۶۱-۳ مثالی از کروماتوگرافی تعویض یونی. دیاگرام الوشن (خروجی) یک مخلوط از هموگلوبین‌های F، A1، A2، S و C بر روی کربوکسی‌متیل-سفادکس C-50.

الکتروفورز مویرگی

الکتروفورز در داخل یک لوله مویرگی سیلیکایی فیوزشده کارایی جداسازی بالایی دارد، مقادیر بسیار کم نمونه را مصرف می‌کند، و برای آزمایش نیازمند تنها چند دقیقه زمان می‌باشد. یک لوله مویرگی با محیط الکتروفورتیک پر شده، یک نمونه به‌صورت یک باند باریک در نزدیکی انتهای آند تزریق شده و ملکول‌های نمونه براساس حرکت به‌سمت قطب دارای بار منفی جدا می‌شوند. دیواره سیلیکایی فیوزشده مویرگ بار منفی دارد و یک لایه کاتیونی متحرک بر روی آن ثابت می‌باشد. در یک میدان الکتریکی برقرارشده، یک لایه انتشاری در مجاورت کاتیون‌ها، به‌سمت کاتد حرکت کرده و جریانی از مواد حل‌شده به سمت کاتد را فراهم می‌سازد. این جریان الکترو-اسموتیک، «جریانی» را به وجود می‌آورد که ملکول‌های آنالیت را، بدون توجه به بار آنالیت، به‌سمت کاتد حمل می‌کند (شکل ۶۲-۳). ملکول‌های دارای یک نسبت بار به جرم بسیار مثبت با این جریان حرکت کرده و بیشترین حرکت را دارند که به دنبال آنها ملکول‌های خنثی حرکت می‌کنند. ملکول‌های آنیونی که توسط کاتد دفع می‌شوند، برخلاف جریان الکترو-اسموتیک حرکت خواهند نمود. هر چند، جریان الکترو-اسموتیک به‌سمت کاتد بر هر نوع مهاجرت منفی غلبه می‌کند، و آنیون‌ها نیز، ولی با سرعت آهسته‌تر از ملکول‌های کاتیونی یا خنثی، به سمت کاتد می‌روند.

در الکتروفورز ناحیه‌ای[1] جداسازی براساس وجود یک بافر می‌باشد. الکتروفورز مویرگی ممکن است در حضور آمفولیت‌ها برای جداسازی پروتئین‌ها به‌طریق تمرکز ایزوالکتریک، در حضور ژل متخلخل برای جداسازی پروتئین‌ها براساس وزن ملکولی یا

1. Zone electrophoresis



شکل ۶۲-۳ تولید جریان الکترواسموتیک به‌سمت کاتد در الکتروفورز موئینه‌ای.

در حضور یک جزء میسلی برای جداسازی براساس خاصیت آبگریزی انجام شود. آشکار-سازهایی که از نور UV، فلورسانس، اسپکتروسکوپی Raman، آشکارسازی الکتروشیمیایی، یا اسپکترومتری جرمی بهره می‌برند، روش مویرگی را حساس و فراگیر کرده‌اند.

جداسازی پروتئین‌ها براساس جرم و اندازه ملکولی

اولتراسانتریفوژ: تعریف ضریب سودبرگ

پروتئینی که در معرض نیروی سانتریفوژ قرار می‌گیرد، در جهت این نیرو با سرعتی متناسب بـا جرم آن حرکت می‌کند. سرعت حرکت توسط یک سیستم آشکارساز نوری مناسب اندازه‌گیری می‌شود و بـراساس این سرعت، ضریب رسوب بـرحسب **واحد سودبرگ**[1] (واحد 10^{-13} s) محاسبه می‌گردد. در معادله (شکل ۶۳-۳)، v سرعت اندازه‌گیری‌شده حرکت پروتئین، w سرعت زاویه‌ای روتور سانتریفوژ، و r فاصله از مرکز لوله‌ای که در آن پروتئین قرار داده شده است تا مرکز چرخش می‌باشد. ضرایب رسوب بین ۱ و ۲۰۰ واحد سودبرگ (S) برای پروتئین‌ها پیدا شده است (جدول ۱۸-۳). معادلاتی به‌دست آمده‌اند که ضریب رسوب را با جرم ملکولی یک پروتئین مرتبط می‌سازند. یکی از ساده‌ترین معادلات در شکل ۶۴-۳ نشان داده شده است که در آن R ثابت گازها، T درجه حرارت، s ضریب رسوب، و D ضریب انتشار پروتئین، v حجم اختصاصی نسبی پروتئین، و p چگالی حلال می‌باشد. لازم است مقادیر D و v طی آزمایشات مستقل اندازه‌گیری شوند. در این معادله یک هندسه کروی برای پروتئین در نظر گرفته شده است. از آنجایی که این فرض ممکن است صادق نباشد و اندازه‌گیرهای مستقل D و v مشکل است، معمولاً تنها ضریب رسوب ملکول گزارش می‌شود. ضریب رسوب یک پروتئین معیار کیفی از جرم ملکولی آن است.

$$s = \frac{v}{\omega^2 r}$$

شکل ۶۳-۳ معادله محاسبه ضریب سودبرگ.

$$\text{وزن ملکولی} = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

شکل ۶۴-۳ معادله ارتباط بین ضریب سود برگ و وزن ملکولی.

1. Svedberg unit

جدول ۱۸-۳ • ضرایب رسوب سودبرگ چند پروتئین پلاسمایی

پروتئین	$s_{20,w} \times 10^{-13}$ ($cms^{-1}dym^{-1}$)[a]	وزن ملکولی
لیزوزوم	۲٫۱۹	۱۵,۰۰۰-۱۶,۰۰۰
آلبومین	۴٫۶۱	۶۹,۰۰۰
ایمونوگلبولین G	۶٫۶-۷٫۲	۱۵۳,۰۰۰
فیبرینوژن	۷٫۶۳	۳۴۱,۰۰۰
GI_q (فاکتور کمپلمان)	۱۱٫۱	۴۱۰,۰۰۰
α_2 - ماکروگلبولین	۱۹٫۶	۸۲۰,۰۰۰
ایمونوگلبولین M	۱۸-۲۸	۱,۰۰۰,۰۰۰
فاکتور VIII انعقاد خون	۲۳-۷	۱,۱۲۰,۰۰۰

[1] $s_{20} \times 10^{-13}$ ضریب رسوب در واحد سود برگ در آب ۲۰ درجه سانتیگراد است که نسبت به غلظت صفر پروتئین محاسبه می‌شود.

کروماتوگرافی رد ملکولی

معمولاً از یک ژل متخلخل به شکل مهره‌های کوچک برای جداسازی پروتئین‌ها براساس اندازه در کروماتوگرافی ستونی استفاده می‌شود. پروتئین‌های کوچک وارد منافذ ژل شده و در مقایسه با پروتئین‌های بزرگ که وارد منافذ نمی‌شوند، حجم حلال بزرگتری دارند که می‌بایست در ستون طی کنند. بر این اساس، پروتئین‌های موجود در یک مخلوط براساس اندازه از یکدیگر جدا می‌شوند. در ابتدا پروتئین‌های بزرگتر و به دنبال آنها پروتئین‌های کوچکتر الوت (خارج) می‌شوند که حرکت آنها به دلیل دسترسی به حجم بزرگتر حلال دچار تأخیر می‌شود (شکل ۶۵-۳). همانند اولتراسانتریفوژ یک فرض وجود دارد، زیرا هندسه یک پروتئین ناشناخته در تعیین جرم ملکولی آن مؤثر است. وقتی از یک منحنی استاندارد تهیه شده با پروتئین‌های دارای هندسه کروی استفاده می‌شود، اغلب جرم ملکولی پروتئین‌های غیرکروی امتدادیافته و همچنین گلیکوپروتئین‌ها اشتباه تعیین می‌شود.



شکل ۶۵-۳ کروماتوگرافی رد ملکولی. یک پروتئین کوچک می‌تواند وارد ذرات ژلی متخلخل شده و نسبت به پروتئین بزرگی که نمی‌تواند وارد این ذرات ژلی متخلخل شود، با تأخیر از ستون خارج می‌شود.

الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید در حضور یک دترژنت

در صورتی که یک دترژنت باردار به یک آزمون الکتروفورز پروتئین اضافه شود و الکتروفورز از طریق یک محیط پشتیبان غربالی صورت پذیرد، جداسازی پروتئین‌ها براساس اندازه و نه بار خواهد بود. **سدیم دودسیل سولفات**[1] (SDS) یک دترژنت و **پلی‌آکریل‌آمید دارای اتصالات عرضی** یک محیط پشتیبان غربالی هستند. دودسیل سولفات‌ها شامل سولفات‌های آلکیلی ۱۲ کربنه آمفی‌پاتیکی هستند که یک پروتئین دناتوره را با ایجاد قشر حلالیت میسلی SDS باردار در اطراف زنجیر پلی‌پپتیدی، پایدار می‌سازند. بار ذاتی زنجیر پلی‌پپتیدی توسط

1. Sodium dodecyl sulfate

ملکول‌های SDS دارای بار منفی حذف شده و هر تجمع حل‌شده پروتئین-SDS یک نسبت بار به حجم یکسان به‌دست می‌آورد. ذرات دارای بار منفی از میان ژل پلی‌آکریلامید به سمت آند حرکت می‌کنند. پلی‌آکریلامید به‌عنوان یک غربال ملکولی عمل می‌کند و کمپلکس‌های پروتئین-میسل براساس اندازه جدا می‌شوند؛ پروتئین‌های دارای جرم بزرگتر دچار تأخیر می‌شوند. یک باند در الکتروفورز بر روی SDS پلی‌آکریلامید، اغلب مربوط به یک پروتئین خالص است. کونفورماسیون ساختمان بومی در محاسبه جرم ملکولی نقشی ندارد، زیرا جرم ملکولی در مقایسه با استانداردهای شناخته‌شده‌ای تعیین می‌شود که به شکل مشابهی دناتوره شده‌اند. دترژنت ساختمان چهارم یک پروتئین چند زیرواحدی را از بین برده و زیرواحدهای تشکیل‌دهنده را آزاد می‌کند. با این روش، تنها جرم ملکولی زیرواحدهای چنین پروتئینی تعیین می‌گردد.

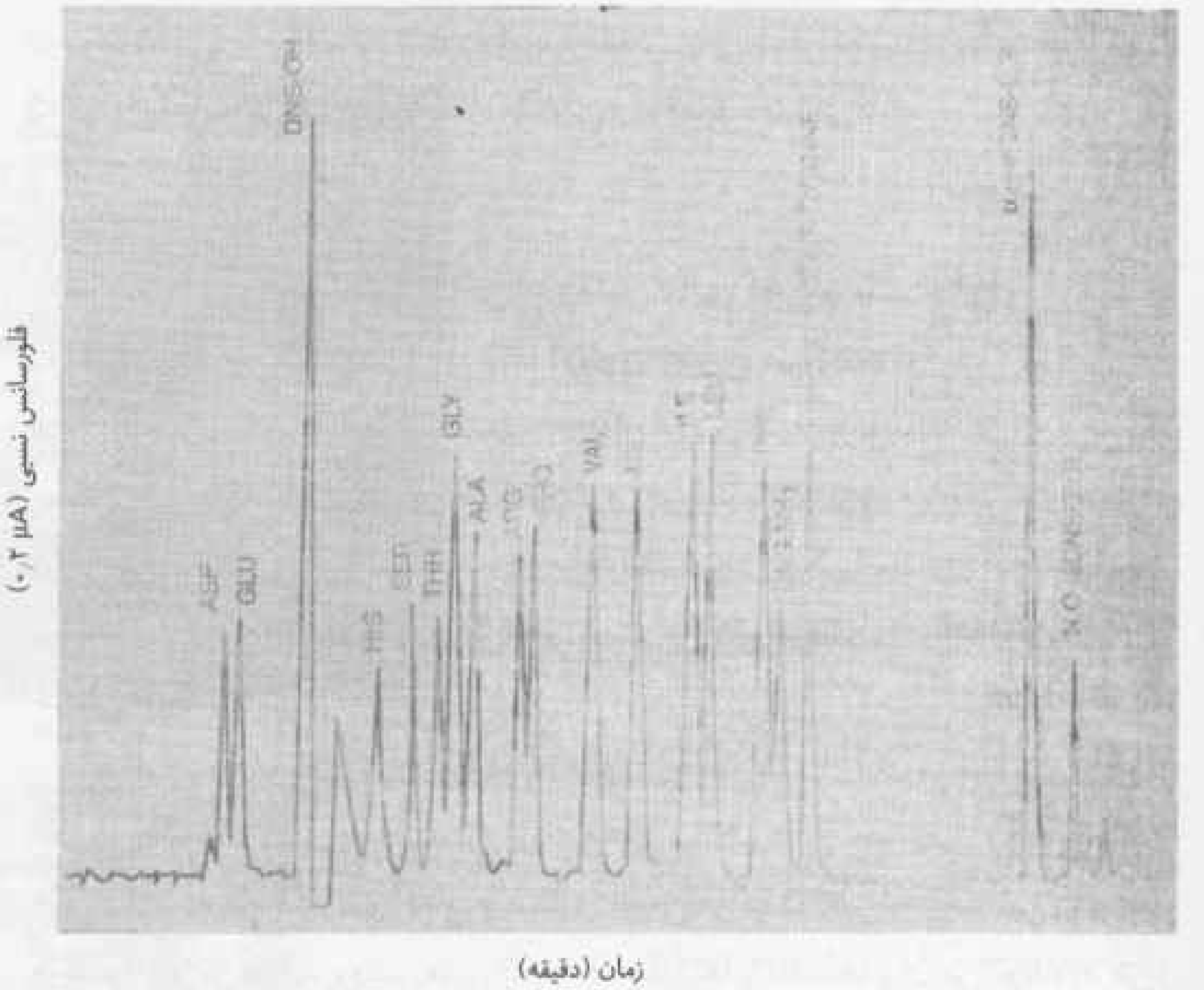
اسیدهای آمینه، پپتیدها و پروتئین‌ها با تکنیک‌های HPLC جدا می‌شوند

در کروماتوگرافی مایع باکارایی-بالا[1] (HPLC)، یک حلال مایع حاوی مخلوطی از ملکول‌هایی که قرار است تعیین هویت شوند، از میان ستونی عبور می‌کند که به شکل متراکمی با یک رزین مهره مانند نامحلول دارای قطر کوچک پر شده است. در کروماتوگرافی ستونی، هرچه مهره‌های رزین کوچکتر بوده و تراکم بیشتری داشته باشند، قدرت تفکیک تکنیک جداسازی بیشتر خواهد بود. در HPLC، این رزین آنقدر متراکم است که لازم است مایع با فشار بالا در میان ستون پمپ شود. لذا در HPLC از پمپ‌های فشار- بالای دقیق به همراه لوله‌ها و ستون‌های فلزی به‌جای شیشه‌ای یا پلاستیکی مورد استفاده در کروماتوگرافی وزنی، استفاده می‌گردد. مهره‌های رزین با گروه‌های باردار برای جداسازی ترکیبات به طریق تعویض یونی، و یا با گروه‌های آبگریز برای تأخیر در حرکت ملکول‌های غیرقطبی آبگریز، پوشانده می‌شوند. در کروماتوگرافی آبگریز، ترکیبات غیرقطبی که اتصال محکم پیدا کرده‌اند، در حلال‌های حاوی درصدهای مختلف یک معرف آلی از مهره‌های آبگریز الوت می‌شوند. هرچه درصد حلال آلی موجود در مایع خروجی بیشتر باشد، جزء غیرقطبی زودتر از رزین آبگریز الوت می‌شود. این نوع کروماتوگرافی در برابر مهره‌های رزینی غیرقطبی را HPLC **فاز-معکوس** گویند (شکل ۶۶-۳). جداسازی به‌طریق HPLC دارای قدرت تفکیک و قابلیت تکرار بالایی است.

کروماتوگرافی تمایلی

پروتئین‌ها تمایل بالایی برای سوبستراها، گروه‌های پروستتیک، گیرنده‌های غشایی یا مهار-کننده‌های غیرکووالان اختصاصی و همچنین برای آنتی‌بادی‌های تولیدی بر علیه آنها دارند. این ترکیبات دارای تمایل بالا را می‌توان به‌طریق کووالان به یک رزین نامحلول متصل نمود و سپس رزین تغییریافته را در تخلیص پروتئین مربوط به آن در کروماتوگرافی ستونی بکار

1. High-performance liquid chromatography



شکل ۶۶-۳ جداسازی اسیدهای آمینه با استفاده از HPLC فاز ـ معکوس. محور x زمان الوشن (خروج) از ستون است. اسیدهای آمینه از طریق واکنش با دانسیل کلراید (DNS) طوری مشتق‌سازی می‌شوند که یک نوع فلورسانس را نشر دهند. از این فلورسانس برای آزمایش این اسیدهای آمینه در هنگام خروج از ستون استفاده می‌گردد.

برد. در مخلوطی از پروتئین‌هایی که از میان رزین الوت می‌شوند، پروتئین مورد نظر به‌طور انتخابی با تأخیر خارج می‌گردد.

رهیافت عمومی برای تخلیص پروتئین

قبل از تعیین ترکیب، ساختمان و فعالیت یک پروتئین، لازم است آن پروتئین تخلیص شود. از آنجایی‌که سلول‌های زنده هزاران پروتئین که از نظر ژنتیکی متفاوت هستند، و همچنین هزاران لیپید، پلی‌ساکارید و پلی‌نوکلئوتید دارند، ممکن است تخلیص یک پروتئین از سایر اجزاء سلولی مشکل باشد. اولین کار ابداع یک آزمون ساده برای پروتئین است. این آزمون براساس این که از سرعت تغییر سوبسترا به محصول، واکنش آنتی‌ژن ـ آنتی‌بادی، یا یک پاسخ فیزیولوژیکی در یک سیستم آزمون حیوانی استفاده می‌کند، می‌بایست قادر به اندازه‌گیری کمّی فعالیت در هر واحد غلظت پروتئین باشد. این کمّیت را **فعالیت ویژه**[1] نمونه می‌گویند. هدف روش خالص‌سازی افزایش فعالیت ویژه نمونه به میزانی است که برای پروتئین مورد نظر می‌توان انتظار داشت. یکی از پروتوکل‌های معمول تخلیص یک پروتئین سلولی محلول، مستلزم انتشار غشاءهای سلولی و به‌دنبال آن سانتریفوژ تمایزی در یک شیب چگالی برای جداسازی پروتئین از ذرات تحت‌سلولی و تجمعات با وزن ملکولی بالا می‌باشد. برای تخلیص بعدی ممکن است از رسوب انتخابی توسط املاح معدنی نظیر سولفات آمونیوم

1. Specific activity

(رسوب نمکی) یا حلال آلی استفاده شود. تخلیص نهایی شامل ترکیبی از تکنیک‌هایی است که آنها را براساس بار ملکولی، اندازه ملکولی و یا تمایل جدا می‌کنند.

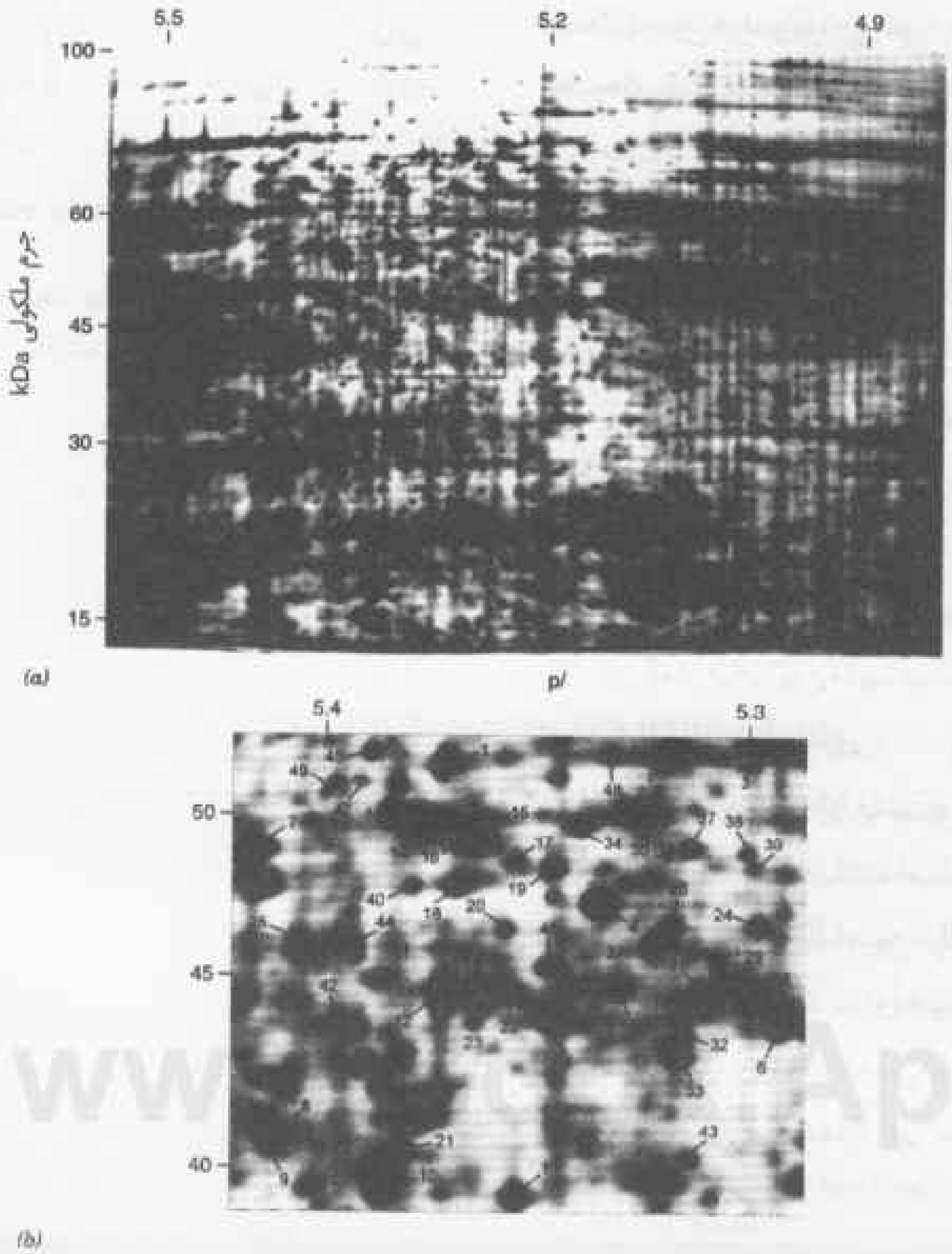
تکنیک‌های پروتئومیک تمامی پروتئین‌هایی که در یک سلول یا بافت بیان می‌شوند را با یک آزمون تعیین می‌کنند

تعداد ژن‌های بی‌همتای انسانی حدود ۲۵۰۰۰ برآورد می‌شود. با توجه به این که از یک ژن ممکن است به‌واسطه اسپلایسینگ متفاوت و تغییرات بعد از ترجمه پروتئین‌های متعددی تولید شود، تعداد پروتئین‌های بی همتای موجود در انسان ممکن است به یک میلیون برسد. **پروتئومیک**[1] علم تعیین دقیق پروتئین‌هایی است که در یک سلول یا بافت، تحت شرایط خاصی تولید می‌شوند.

هر نوع سلول یا بافتی هزاران پروتئین مختلف را به‌طور همزمان بیان می‌کند. برای شناخت خصوصیات یک سلول یا بافت، نوع پروتئین‌های بیان‌شونده و نحوه تغییر الگوی پروتئین‌-های بیان‌شده براساس نمو، تمایز و بیماری تعیین می‌گردد. اخیراً تکنیک‌هایی برای آنالیز محصولات ژنی فعال، پروتئین‌هایی که توسط سلول‌ها یا بافت‌ها بیان می‌شوند، به طریق الکتروفورز دو-بُعدی (2-D) ابداع شده است. در اینجا، پروتئین‌ها ابتدا از سلول‌ها یا بافت‌ها استخراج شده و سپس بر روی ژل پلی‌آکریلامید در یک دستگاه الکتروفورز لکه‌گذاری می‌شوند. پروتئین‌ها در والین بُعد براساس تفاوت در pI خود جدا می‌شوند. سپس ژل به اندازه ۹۰°C چرخانده شده و SDS به بافر اضافه می‌گردد. پروتئین‌ها در دومین بُعد براساس تفاوت در وزن‌ملکولی خود جدا می‌شوند (الکتروفورز ژلی در حضور دترژنت را ببینید). ژل حاصل از نظر پروتئین رنگ‌آمیزی‌شده و شدت هر کدام از هزاران لکه پروتئینی تعیین شده تا بیان و غلظت یک پروتئین خاص مشخص گردد (شکل ۶۷-۳).

تعیین هویت هر کدام از لکه‌های پروتئینی در ژل 2-D یک کار کوچک نیست. در صورت انجام تحت شرایط استاندارد، الگوی ژل 2-D ممکن است با الگوهای حاصل از آزمایشگاه‌های مرجع مقایسه شوند که هویت اکثریت لکه‌ها را در الگوی 2-D یک نوع سلول خاص تعیین کرده‌اند. به شکل قطعی‌تری، یک لکه ممکن است از ژل استخراج شده و پروتئین آن به طریق هضم آنزیمی پروتئولیتیک (برای مثال، با تریپسین یا کیموتریپسین) به‌طور نسبی به قطعات پپتیدی کوچکتر هیدرولیز شود و قطعات پپتیدی در معرض اسپکترو-متری جرمی قرار گیرند. با اسپکترومتری جرمی سریعاً توالی اسید آمینه‌ای بسیاری از قطعات کوچک تعیین می‌شود. این تکنیک را **انگشت‌نگاری جرمی**[2] گویند. استفاده از این توالی‌ها برای جستجوی توالی پروتئینی یا پایگاه‌های توالی ژنی، منتهی به تعیین هویت پروتئین استخراج شده از ژل 2-D می‌شود. هم اکنون تجهیزات روباتیک تمامی مراحل استخراج و تعیین

1. Proteomics 2. Mass fingerprinting



شکل ۶۷-۳ یک نمایش دو-بُعدی (2-D) پروتئین‌های بیان‌شده در سلول‌های کشت‌شده. (a) پروتئین‌های محلول استخراج‌شده از سلول (۵۰۰μg) بر روی ژل قرار داده شدند و به طریق تمرکز ایزوالکتریک (pH بین ۴٫۹ و ۵٫۵) در جهت افقی و براساس جرم ملکولی در جهت عمودی (الکتروفورز در حضور دترژنت SDS) جدا شدند. با رنگ‌آمیزی نقره بیش از ۱۵۰۰ پروتئین مشاهده می‌شوند. (b) ناحیه‌ای از ژل بزرگ شده است تا جزئیات مشخص گردد. پروتئین‌های شماره‌گذاری شده به طریق هیدرولیز توسط پروتئاز و اسپکترمتری جرمی آنالیز شدند تا توالی اسید آمینه‌ای نسبی آنها تعیین گردد که نتیجه تعیین هویت آنها می‌باشد.

هویت لکه پروتئینی را انجام می‌دهند. به این طریق، هزاران پروتئین بیان‌شده ممکن است مورد شناسایی قرار گیرند.

در حال حاضر این تکنیک قادر به شناسایی پروتئین‌هایی نیست که به مقادیر کم در سلول‌ها یا بافت‌ها وجود دارند. به‌علاوه، به دلیل حلالیت کم، بار ملکولی پایین، یا جرم ملکولی بسیار پایین، آنالیز برخی انواع پروتئین‌ها مشکل است. برای مثال، پروتئین‌های غشایی داخلی شدیداً آبگریز هستند و در حلال‌های استاندارد تمرکز ایزوالکتریک محلول نمی‌باشند.

تعیین ترکیب اسید آمینه‌ای یک پروتئین

تعیین ترکیب اسید آمینه‌ای یکی از مراحل اصلی در مطالعه ساختمان و خصوصیات فیزیولوژیکی یک پروتئین است. یک پروتئین در یک لوله بسته و تحت شرایط خلاء برای جلوگیری از تخریب زنجیرهای جانبی حساس به اکسیداسیون توسط اکسیژن موجود در هوا، با استفاده از حرارت ۱۱۰°C در HCl شش نرمال برای ۳۶-۱۸ ساعت به اجزاء اسید

آمینه‌ای خود هیدرولیز می‌شود. در این روش تریپتوفان تجزیه شده و برای آنالیز آن از روش‌های دیگری استفاده می‌شود. آمیدهای زنجیر جانبی آسپاراژین و گلوتامین به آسپاراتات و گلوتامات و آمونیاک آزاد هیدرولیز می‌شوند؛ اینها به محتوای اسید گلوتامیکی و اسید آسپارتیکی آنالیز اضافه می‌گردند.

در روش‌های معمول برای تعیین‌هویت اسیدهای آمینه از کروماتوگرافی تعویض-یونی یا HPLC فاز مُعکوس برای جداسازی آنها و سپس واکنش با نین‌هیدرین، فلوروسکامین، دانسیل کلراید یا معرف‌های کروموفوریک یا فلوروفوریک مشابه برای تعیین مقدار استفاده می‌شود. در مورد برخی انواع مشتق‌سازی‌ها، اسیدهای آمینه در غلظت‌های $0{,}5\times10^{-12}$ mol (پیکومول) شناسایی می‌شوند. آنالیز ترکیب اسید آمینه‌ای مایعـات فیزیولوژیک (یعنی، خون یا ادرار) در تشخیص بیماری مورد استفاده قـرار می‌گیرد (ارتباط بالینی ۷-۳).

تعیین توالی اسید آمینه‌ای

توانایی در کلون‌سازی ژن‌ها منجر به توانایی در تعیین توالی اسید آمینه‌ای یک پروتئین از توالی DNA یا RNA آن شده است. این اغلب روش بسیار سریع‌تری برای تعیین توالی اسید آمینه‌ای است. هرچند، تعیین توالی یک پروتئین برای تعیین تغییرات پروتئینی که بعد از بیوسنتز آن رخ داده است، برای تعیین‌هویت قسمتی از توالی پروتئین به‌منظور این که بتوان ژن آن را کلون نمود، و برای تعیین‌هویت یک پروتئین به‌عنوان محصول یک ژن خاص، لازم می‌باشد. تعیین ساختمان اول یک پروتئین نیاز به یک پروتئین خالص و تعیین تعداد

ارتباط بالینی ۷-۳

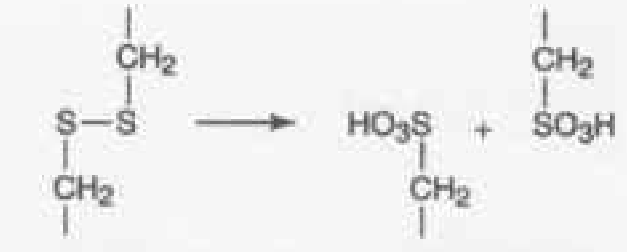
استفاده از آنالیز اسیدهای آمینه در تشخیص بیماری‌ها

در تعدادی از ناهنجاری‌های بالینی، افزایش غلظت اسیدهای آمینه در پلاسما یا ادرار وجود دارد. وقتی غلظت اسید آمینه ادراری به‌طور غیرطبیعی بالا است، به آن آمینواسیدوری گفته می‌شود.

آمینو اسیدوری‌های انسانی

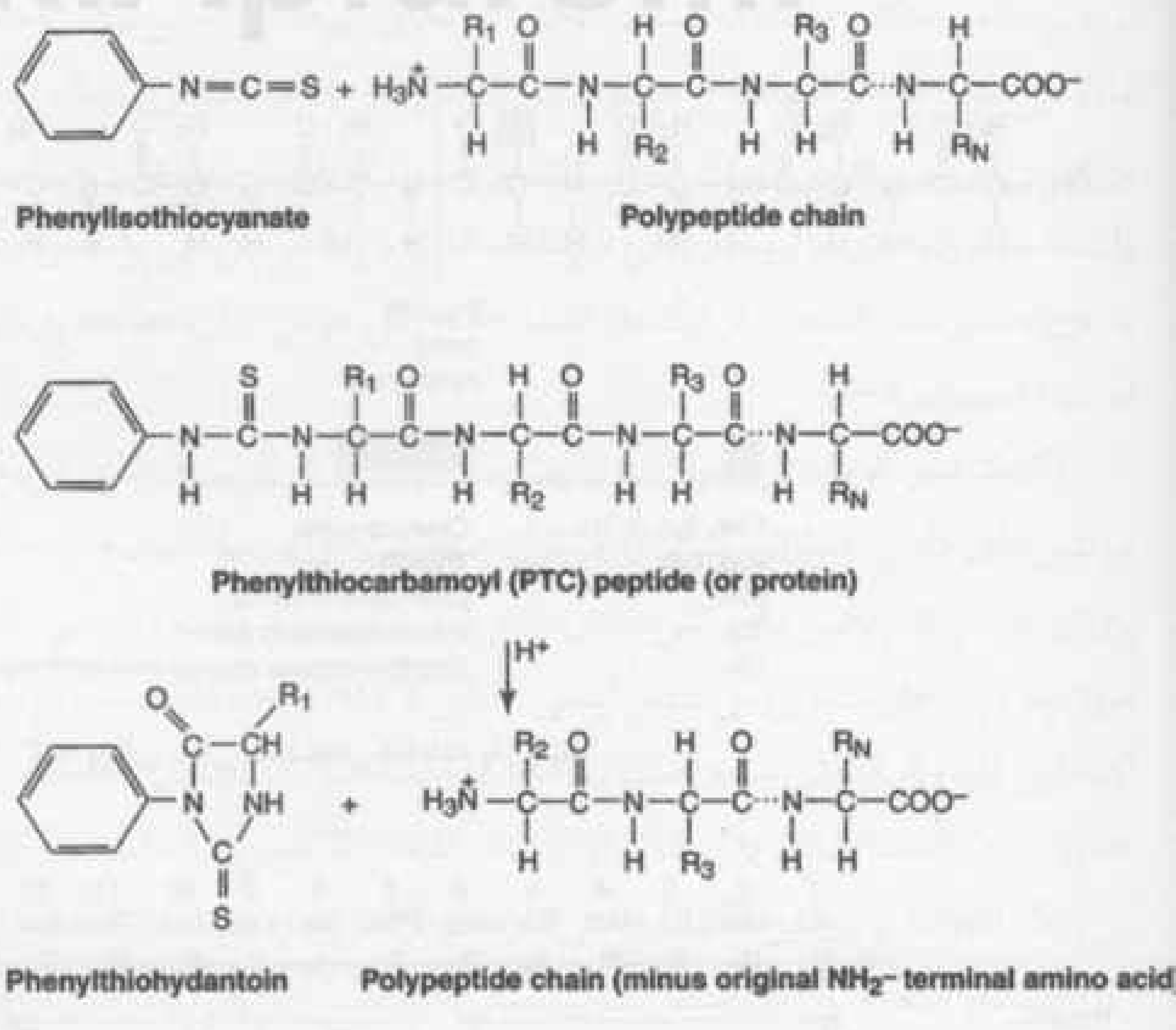
اسید(های) آمینه افزایش یافته	آمینواسیدوری	ارتباط بالینی
Phe	فنیل‌کتونوری	۷-۱۹
Cys, Lys, Arg، اورنیتین	سیستینوری	۱۱-۱۹
Lys, Arg، اورنیتین	عدم تحمل پروتئین لیزینوریک	۱۵-۱۹
اسیدهای آمینه خنثی (منوکربوکسیلیک منوآمینو)	ناهنجاری هارتناپ	۵-۲۵
کمبود Trp		
Gly، هیدروکسی‌پرولین، Pro	ایمینوگلیسینوری	۵-۱۹
Asp, Glu	آمنواسیدوری دی‌کربوکسیلیک	

زنجیرهای موجود در آن دارد. زنجیرهای مجزا با همان تکنیک‌هایی تخلیص می‌شوند که در تخلیص کل پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صورتی که پیوندهای دی‌سولفیدی زنجیرها را به یکدیگر متصل کنند، لازم است این پیوندها شکسته شوند (شکل ۶۸-۳).



شکل ۶۸-۳   شکستن پیوندهای دی‌سولفیدی از طریق اکسیداسیون به اسیدهای سیستئیک.

پلی‌پپتیدها بیشتر توسط **واکنش ادمن**[1] یا به طریق اسپکترومتری جرمی تعیین توالی می‌شوند. در واکنش ادمن، زنجیر پلی‌پپتیدی با فنیل‌ایزوتیوسیانات مجاور می‌شود که با گروه آمینوی انتهای آمینو واکنش می‌کند. شرایط اسیدی سبب ایجاد حلقه درون‌ملکولی می‌شود که اسید آمینه انتهای آمینو را به‌صورت یک مشتق فنیل‌تیوهیدانتوئین می‌شکند (شکل ۶۹-۳). این مشتق اسید آمینه ممکن است به‌طریق کروماتوگرافی جدا و در برابر استانداردها تعیین هویت شود. پلی‌پپتید باقیمانده جدا شده و واکنش ادمن برای تعیین هویت اسید آمینه انتهای آمینو تکرار می‌شود. از نظر تئوری، این عمل را می‌توان تا تعیین توالی کامل پلی‌پپتیدی انجام دهد، ولی تحت شرایط مناسب تنها می‌توان این عمل را برای ۳۰ یا ۴۰ اسید آمینه موجود در زنجیر پلی‌پپتیدی انجام داد؛ در این زمان ناخالصی‌های حاصل از واکنش‌های ناکامل موجود در مجموعه‌های واکنش ادامه **چرخه‌های ادمن** را غیرعملی می‌کنند. پلی‌پپتیدهایی که بیش از ۳۰ تا ۴۰ اسید آمینه دارند، به قطعات کوچکتر هیدرولیز شده و در چند بخش تعیین‌توالی می‌شوند. برای تعیین‌توالی به طریق اسپکترو- متری جرمی، نیز لازم است زنجیرهای پلی‌پپتیدی بلند به قطعات کوچکتر تجزیه شوند.



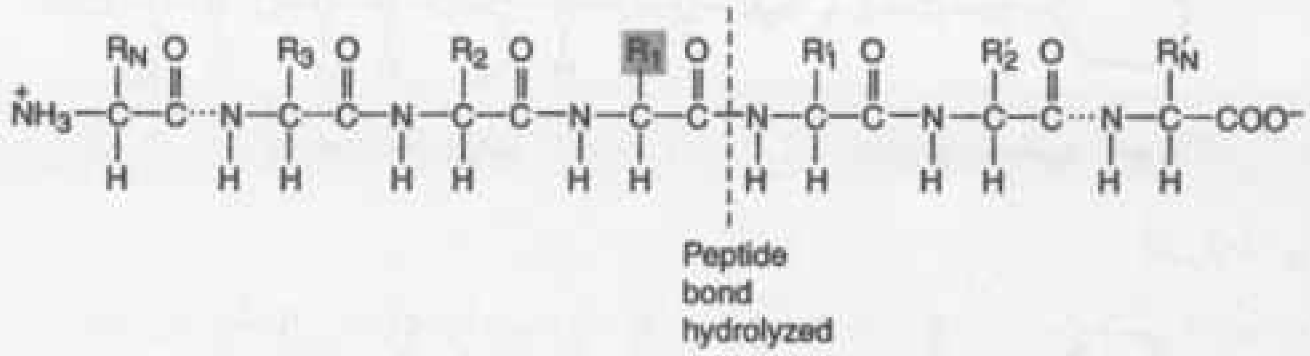
شکل ۶۹-۳   واکنش ادمن.

1. Edman reaction

برای تجزیه زنجیرهای پلی‌پپتیدی به قطعات کوچکتر، از روش‌های آنزیمی و شیمیایی استفاده می‌شود (شکل ۷۰-۳). **تریپسین** ترجیحاً پیوند پپتیدی موجود در سمت کربوکسیل لیزین و آرژنین را در زنجیرهای پلی‌پپتیدی می‌شکند. **کیموتریپسین** پیوند پپتیدی موجود در سمت کربوکسیل زنجیرهای جانبی غیرقطبی بزرگ را می‌شکند. سایر آنزیم‌ها زنجیرهای پلی‌پپتیدی موجود را در سمت انتهای کربوکسیل اسید گلوتامیک و اسید آسپارتیک می‌شکنند. **سیانوژن بروميد** پیوندهای پپتیدی را در سمت انتهای کربوکسیل ریشه‌های متیونین تجزیه می‌کند (شکل ۷۰-۳). بعد از **هیدرولیز نسبی**، این قطعات جدا می‌شوند و هر توالی با واکنش ادمن یا اسپکترومتری جرمی تعیین می‌گردد. برای قراردادن صحیح پپتیدهای تعیین‌توالی شده در داخل توالی کامل، نمونه دیگری از پلی‌پپتید ابتدایی در معرض هیدرولیز نسبی توسط یک معرف هیدرولیتیک متفاوت از معرف ابتدایی مورد استفاده، قرار می‌گیرد و قطعات جداشده تعیین‌توالی می‌شوند. بدین‌ترتیب توالی‌های همپوشانی حاصل می‌شوند که تعیین توالی کامل را ممکن می‌سازند (شکل ۷۱-۳).

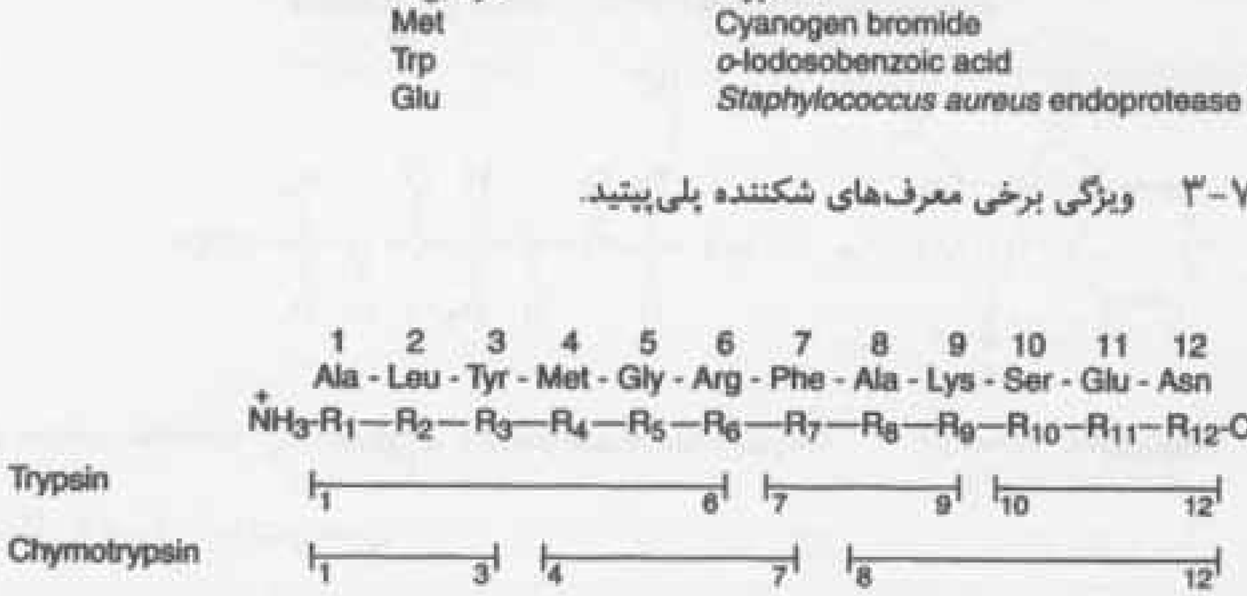
از تکنیک‌های انکسار اشعه X برای تعیین ساختمان سه-بُعدی پروتئین‌ها استفاده می‌شود

انکسار اشعه-X امکان تعیین ساختمان پروتئین‌ها با قدرت تفکیک نزدیک به اتم را فراهم می‌سازد. این روش نیاز به تولید یک کریستال پروتئینی دارد که حاوی حلال است و بنابراین



R₁	Reagent
Phe, Tyr, or Trp	Chymotrypsin
Arg, Lys	Trypsin
Met	Cyanogen bromide
Trp	*o*-Iodosobenzoic acid
Glu	*Staphylococcus aureus* endoprotease V8

شکل ۷۰-۳ ویژگی برخی معرف‌های شکننده پلی‌پپتید.



شکل ۷۱-۳ مرتب‌سازی قطعات پپتیدی به کمک توالی‌های همپوشان تولیدی حاصل از پروتئولیز اختصاصی یک پپتید.

یک محلول غلیظ برای استفاده به‌عنوان هدف می‌باشد. شناخت ما از جزئیات اجزاء ساختمان پروتئین حاصل از این وضعیت کریستالی ارتباط خوبی با سایر اندازه‌گیری‌های فیزیکی ساختمان پـروتئین در محلول دارد (برای مثال، توسط اسپکتروسکوپی NMR؛ ص.۱۸۳).

تولید کریستال‌های پروتئینی می‌تواند وقت‌گیرترین فرایند باشد. ابعاد ملکولی پروتئین‌ها حداقل ۱۰ برابر بیش از یک ملکول کوچک است و بسته‌بندی ملکول‌های پروتئینی بزرگ به‌صورت شبکه‌های کریستالی همراه با تولید کریستالی با «سوراخ‌های» بزرگ یا کانال‌های حلال می‌باشد. یک کریستال پروتئینی معمولاً حاوی ۴۰٪ تا ۶۰٪ حلال است و ممکن است به‌عنوان یک محلول غلیظ درنظر گرفته شود تا یک جامد کریستالی سختی که با اکثر ملکول‌های کوچک به‌دست می‌آید. وجود حلال و حجم اشغال‌نشده در کریستال امکان انفوزیون مهارکننده‌ها و سوبستراها بـه داخل ملکوهای پـروتئین در وضعیت کریستالی را فراهم می‌سازد.

یک **انعطاف‌پذیری پویا**[1] در داخل نواحی ساختمان پروتئین ممکن است به‌صورت بی‌نظمی در الگوی انکسار اشعه-X مشاهده گردد. بی‌نظمی اشاره به موقعیتی دارد که در آن چگالی الکترونی مشاهده شده می‌تواند با بیش از یک کونفورماسیون موضعی منطبق باشد. دو نوع توجیه را می‌بایست تمایز داد. اولی مستلزم وجود دو یا چند کونفورماسیون ملکولی استاتیک می‌باشد که در ارتباط استوکیومتریک وجود دارند. دومی مستلزم دامنه پویایی واقعی حرکتی است که توسط اتم‌ها یا گروه‌های اتم‌ها در نواحی لوکالیزه ملکول نشان داده می‌شود. این توجیهات را می‌توان بـا کاهش درجه حرارت کریستـال به میزانی که بی‌نظمی پویایی «فریز شود»، تمایز داد؛ برعکس، کونفورماسیون‌های استاتیک متعدد وابسته به درجه حرارت نبوده و باقی می‌مانند. آنالیز بی‌نظمی پویایی براساس وابستگی آن به درجه حرارت با استفاده از انکسار اشعه-X، روش مهمی برای مطالعه پویایی پروتئین است (قسمت ۸-۳).

تکنیک‌های کریستالیزاسیون آنقدر پیشرفت کرده‌اند که کریستال‌های مربوط به حتی پروتئین‌های دارای فـراوانی کمتر را می‌توان بـه‌دست آورد. ساختمان‌های جالبی بـرای پروتئین‌ها، از کمپلکس‌های آنتی‌بـادی-آنتی‌ژن، و از محصولات ویروسی نظیر پروتئاز مورد نیاز برای عفونت ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) ایجادکننده سندروم نقص ایمنی اکتسابی (ایدز)، گزارش شده است که در آنها ریشه‌های اختصاصی جایگزین شده‌اند. حدود ۵۰,۰۰۰ ساختمان با استفاده از انکسار اشعه-X تعیین شده است و جزئیات آنها در **بانک اطلاعات پروتئین** نگهداری می‌شوند که از طریق اینترنت قابل دسترسی هستند.

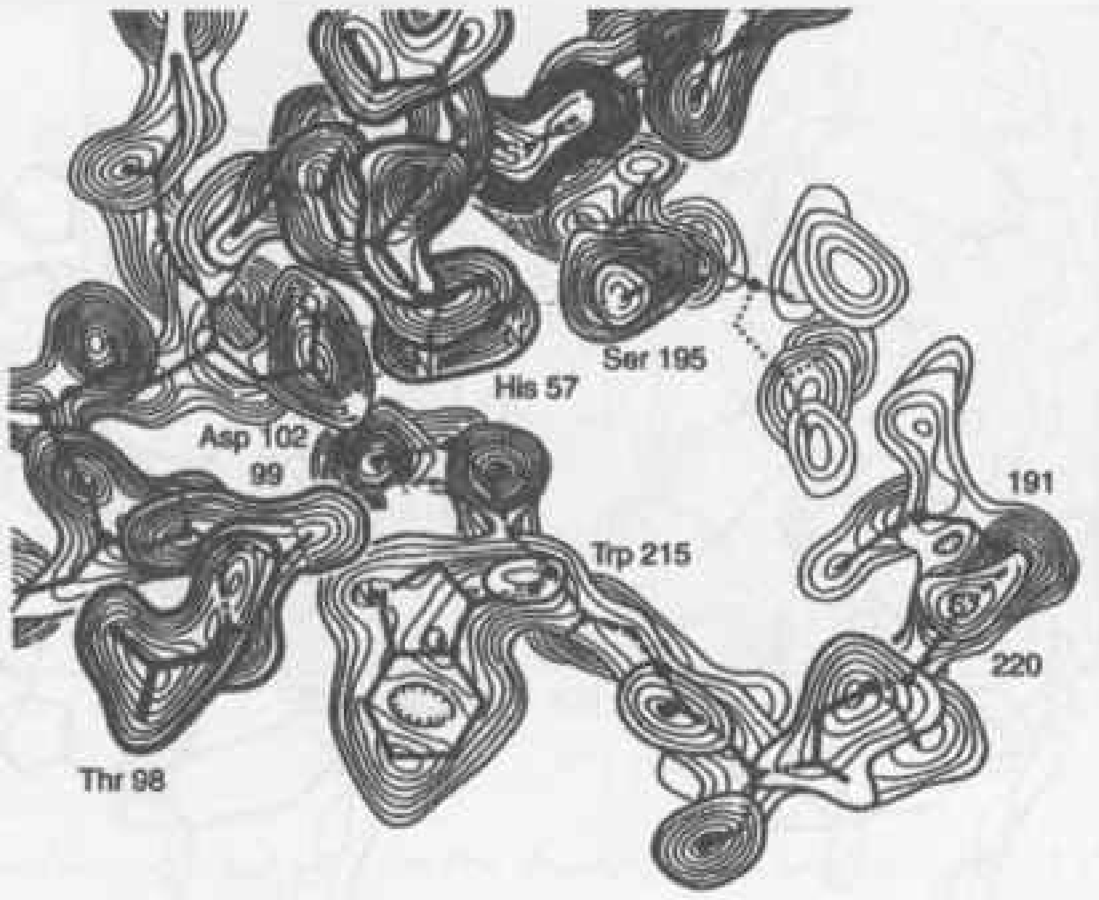
انکسار اشعه‌های-X توسط یک کریستال با تشعشع ورودی با یک طول‌موج مشخص (برای مثال، مس، $K\alpha = ۱٫۵۴$ Å) رخ می‌دهد. پرتوی اشعه-X توسط الکترون‌های موجود

1. Dynamic felxibility

در اطراف هسته‌های اتمی موجود در کریستال با شدتی متناسب با تعداد الکترون‌های موجود در اطراف هسته منکسر می‌شود. لذا این تکنیک **توزیع الکترونی** ملکول را تعیین کرده و توزیع هسته‌ای را نشان می‌دهد. موقعیت‌های واقعی هسته‌های اتمی را می‌توان مستقیماً با انکسار **تشعشع پرتوی نوترونی** تعیین نمود که یک تکنیک جالب ولی بسیار گران است، زیرا نیاز به یک راکتور هسته‌ای یا تسریع‌کننده ذره‌ای دارد. هم اکنون با دسترسی به بالاترین میزان تفکیک در تعیین ساختمان پروتئین به طریق انکسار اشعه-X، می‌توان انکسار اتم‌های C، N، O و S را مشاهده نمود. به دلیل چگالی پایین الکترون‌ها، یعنی یک الکترون در اطراف هسته هیدروژنی، انکسار اتم‌های هیدروژن را نمی‌توان مشاهده نمود. پرتوی منکسرشده معمولاً بر روی فیلم فتوگرافیک یا آشکارسازهای ناحیه الکترونی[1]، مورد جستجو قرار می‌گیرند. این موضوع امکان ضبط بزرگی (شدت) تشعشع انکساریافته در یک جهت خاص را فراهم می‌سازد. از نظر تاریخی، تعیین **زوایای فازی** نیاز به قرار دادن اتم‌های سنگین (نظیر یُد، جیوه یا سرب) در ملکول پروتئین دارند. روش‌های امروزی اغلب می‌توانند بدون استفاده از فلزات سنگین، مشکل فاز را برطرف کنند.

مقایسه کریستالوگرافی اشعه-X با میکروسکوپی نوری برای شناخت فرایند درگیر مناسب است. در میکروسکوپی نوری، تشعشع ورودی توسط جسم مورد مطالعه منکسر شده و پروتون انکساریافته دوباره توسط عدسی شیئی متراکم می‌شود. از نظر اشعه‌های X- ورودی آنالوژی مناسبی وجود دارد، ولی برای تشعشع اشعه-X هیچ ماده‌ای وجود ندارد که همانند عدسی شیئی عمل کند. به‌جای عدسی شیئی، از اندازه‌گیری‌های مربوط به بزرگی و زاویه فازی تشعشع انکساریافته به طریق ریاضی توسط **سنتز فوریر**[2] جهت تعیین یک **نقشه چگالی- الکترونی** سه-بُعدی جسم انکساریافته استفاده می‌شود. برای یک نقشه چگالی-الکترونی با قدرت تفکیک پایین نیاز به صدها انکسار می‌باشد. برای مثال، ۴۰۰ انکسار برای تهیه یک نقشه ۶Å میوگلوبین مورد استفاده قرار گرفت. با این قدرت تفکیک فرد واضحاً می‌تواند ملکول را در داخل سلول واحد کریستال قرار داده و بسته‌بندی کلی زیرواحدها در یک پروتئین مولتیمری را مورد مطالعه قرار دهد. هرچند، ردیابی کونفورماسیون زنجیر پلی‌پپتیدی با مشکل انجام می‌شود. برای تهیه نقشه‌هایی با قدرت تفکیک بالا نیاز به انکسارهای بسیار بیشتری است. برای میوگلوبین که جهت تهیه یک نقشه ۶Å آن از ۴۰۰ انکسار استفاده شد، جهت تهیه یک نقشه ۲Å نیاز به ۱۰,۰۰۰، و جهت تهیه یک نقشه ۱,۴Å نیاز به ۱۷,۰۰۰ انکسار بود. امروزه با استفاده از کامپیوتر، بیشتر کار نسبتاً خودکار شده است. یک برش از نقشه چگالی-الکترونی سه-بُعدی تریپسینوژن در شکل ۷۲-۳ نشان داده شده است. ساختمان اولیه شناخته‌شده به‌واسطه **اصلاح**[3] مطابق با الگوی چگالی-الکترونی می‌شود که فرایند شدیداً کامپیوتر صف‌بندی یک توالی با نقشه چگالی-الکترونی تا رسیدن به بهترین تطابق می‌باشد. (شکل ۷۲-۳)

1. Electronic area detectors 2. Fourier 3. Refinement



شکل ۷۲-۳ نقشه چگالی الکترونی با تفکیک A ۱٫۹ – ناحیه جایگاه فعال شکل پروآنزیمی تریپسین. ریشه‌های اسید آمینه جایگاه فعال بر نقشه چگالی الکترونی منطبق هستند.

انکسار اشعه-X شواهد ناقصی از مکانیسم عمل پروتئینی فراهم می‌کند. در عوض، یک ساختمان متوسطی[1] از یک ملکول را فراهم می‌سازد که به‌طور طبیعی متحمل نوسانات سریع در محلول می‌شود (قسمت ۸-۳). درحقیقت، این ساختمان متوسط ممکن است ساختمان فعال پروتئین در محلول نباشد. در مقیاس زمانی جمع‌آوری داده‌های انکسار، ساختمان‌های مربوط به کمپلکس‌های واکنشگر آنزیم-سوبسترا، ترکیبات واسط و حالات انتقالی واکنش را نمی‌توان مشاهده نمود. این ساختمان‌ها را می‌بایست از تصاویر استاتیک یک شکل فعال پروتئین یا از کمپلکس‌هایی با آنالوگ‌های غیرفعال سوبستراهای آن استنباط نمود (شکل ۷۳-۳).

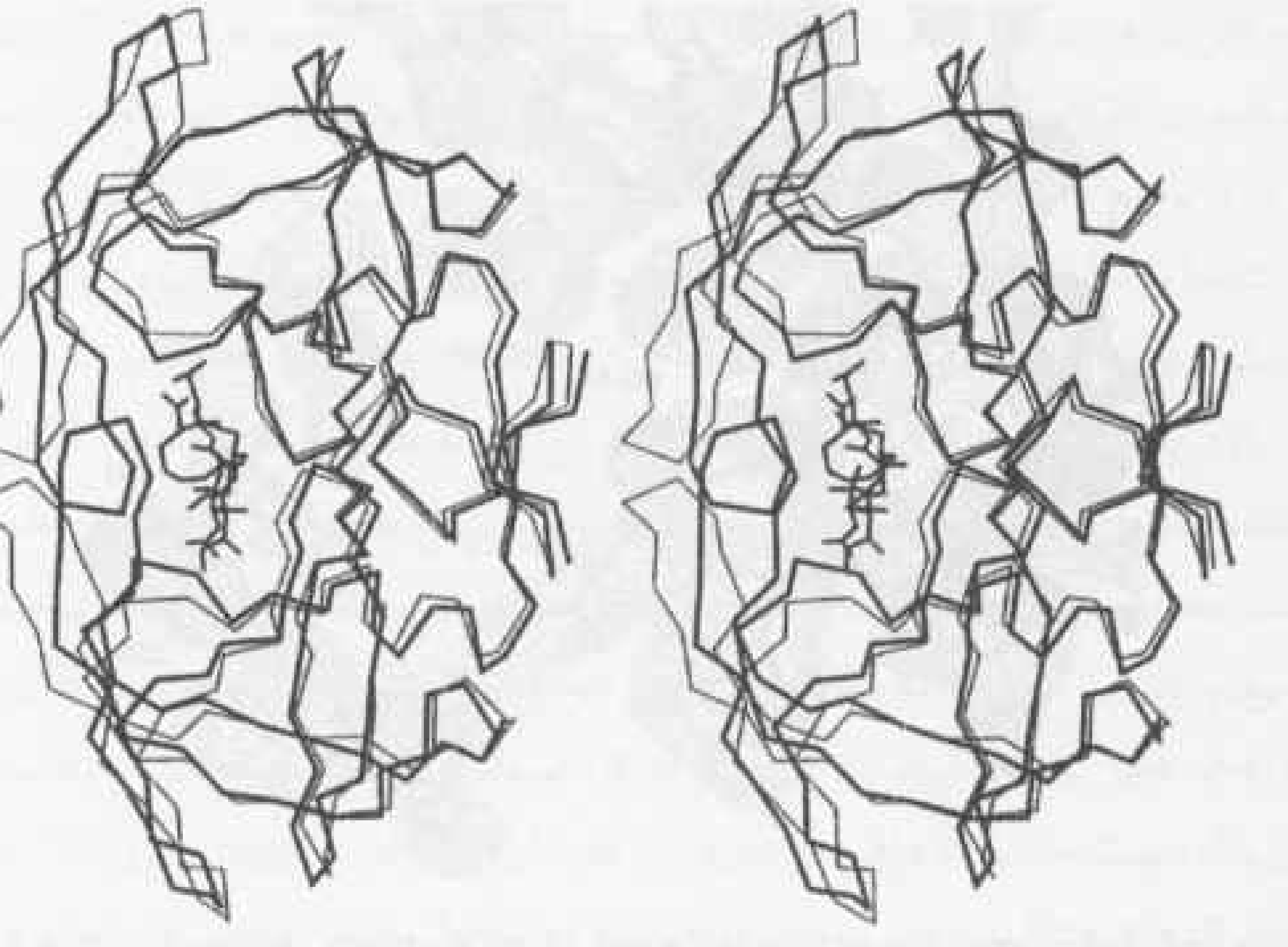
روش‌های جدیدتر انکسار اشعه-X از تشعشع سینکروترون[2] برای تولید یک پرتوی اشعه-X با شدت حداقل ۱۰,۰۰۰ برابر از تولیدکننده‌های استاندارد اشعه-X استفاده می‌کنند که امکان جمع‌آوری داده‌های انکسار ظرف یک مقیاس زمانی میلی‌ثانیه را فراهم می‌کنند. با استفاده از این تکنیک‌ها امکان تعیین ساختمان‌های با عمر کوتاه و حل سؤالات ساختمانی مکانیسمی و دینامیکی که توسط فناوری استاندارد قابل حل نیستند، وجود دارد.

روش‌های اسپکتروسکوپی برای ارزیابی ساختمان و فعالیت پروتئین

اسپکتروسکوپی نور ماوراءبنفش

زنجیرهای جانبی تیروزین، فنیل‌آلانین و تریپتوفان، و پیوندهای پپتیدی، نور اشعه ماوراءبنفش را جذب می‌کنند. کارایی جذب هر **کروموفور** با **ضریب خاموشی مولی** (ε) آن

1. Average structure 2. Synchrotron



شکل ۷۳-۳ ردیابی فضایی یک ساختمان اسکلت کربنی روی‌هم‌قرار گرفته پروتئاز HIV با مهارکننده (خطوط ضخیم) و مورد مربوط به پروتئاز بدون مهارکننده (خطوط نازک).

یک نگاه دقیق‌تر

جذب نور مرئی و ماوراءبنفش یک وابستگی خطی به غلظت و طول مسیر را نشان می‌دهد

قانون بیر-لامبرت یک معادله عملی است که ارتباط خطی بین غلظت یک کروموفور و جذب در یک طول‌موج خاص UV یا نور مرئی را نشان می‌دهد. این معادله به‌صورت زیر است.

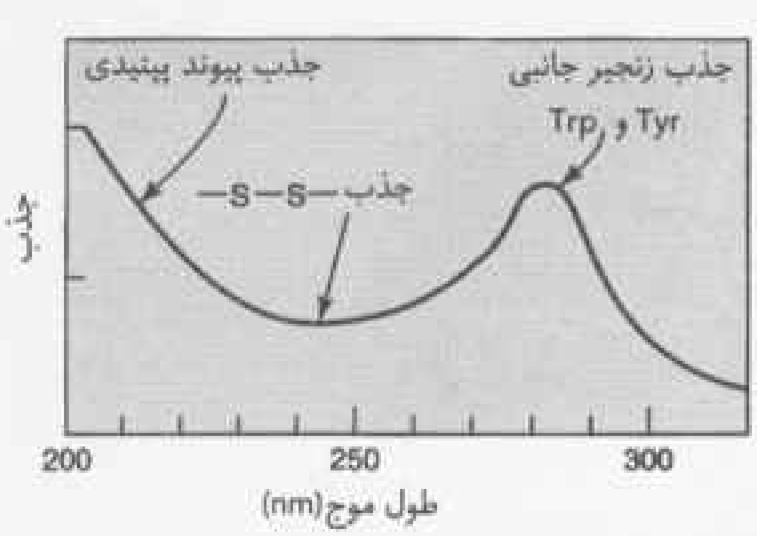
$$A = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c$$

که در آن A جذب نوری در طول موج λ، ε_λ جذب مولی یا ضریب خاموشی کروموفور در طول موج λ، l طولی که نور در داخل محلول طی می‌کند، و c غلظت کروموفور است. ضریب خاموشی یک ثابت برای ملکول کروموفور در شرایط مشخص محلول و درجه حرارت است. در صورتی که ε_λ با واحد $M^{-1}cm^{-1}$ باشد، آنگاه l برحسب cm، c برحسب M و A برحسب واحد جذب خواهد بود.

ارتباط دارد (یک نگاه دقیق‌تر ۲-۳). در شکل ۷۴-۳ یک طیف شاخص نشان داده شده است. جذب بین ۲۶۰ و ۲۸۰ nm اساساً ناشی از زنجیرهای جانبی آروماتیک می‌باشد (شکل ۷۵-۳). وقتی زنجیر جانبی تیروزین در pH بالا یونیزه شود (pK'_a این گروه R حدود ۱۰ است)، جذب به طول‌موج بالاتر جابه جا می‌گردد (جابه‌جایی به‌سمت قرمز) و جذب مـولی آن افزایش می‌یابد (شکل ۷۵-۳). پیوندهای پپتیدی UV دور[1] (۱۸۰-۲۳۰ nm) را جذب می‌کنند.

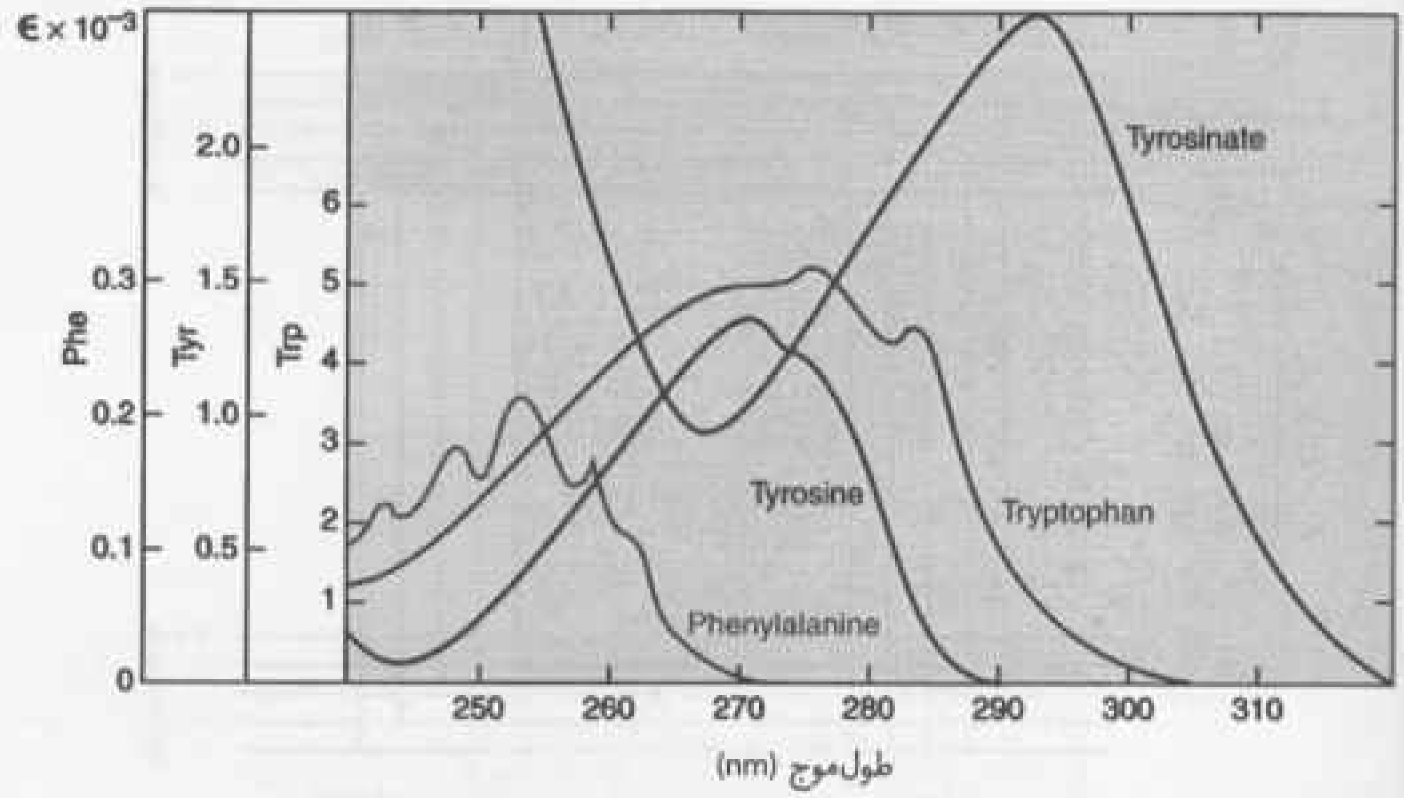
یک پیوند پپتیدی بـا کونفورماسیون مارپیچ α بـا الکترون‌های مربوط به پیوندهای پپتیدی موجود در بالا و پایین آن تعامل نموده و یک **سیستم اکسایتون**[2] به وجود می‌آورد که در آن الکترون‌ها جابه‌جا شده‌اند. نتیجه جابه‌جایی حداکثر جذب یک پیوند پپتیدی ایزوله به یک طول‌موج پایین‌تر یا بالاتر می‌باشد (شکل ۷۶-۳). اسپکتروسکوپی ماوراءبنفش می‌تواند اطلاعاتی را در خصوص ساختمان دوم و سوم پروتئین فراهم کند. وقتی یک پروتئین دنـاتوره می‌شود، بـه‌دلیل از بین رفتن سیستم اکسایتون، تفاوت در خصوصیات جذبی پیوندهایی پپتیدی ظاهر می‌گردد. به‌علاوه، حداکثر جذب برای یک کروموفور آروماتیک در یک محیط آبی نسبت به یک محیط غیرقطبی، در طول‌موج کمتری قرار دارد.

اغلب با اتصال یک پروتئین **جذب مولی**[3] یک سوبسترای کروموفوریک تغییر می‌کند و می‌توان از آن برای اندازه‌گیری ثابت اتصالی آن استفاده نمود. از تغییر در ضرایب خاموشی کروموفور طی کاتالیز آنزیمی برای فراهم‌سازی پارامترهای کینتیکی در هنگام واکنش استفاده می‌شود.

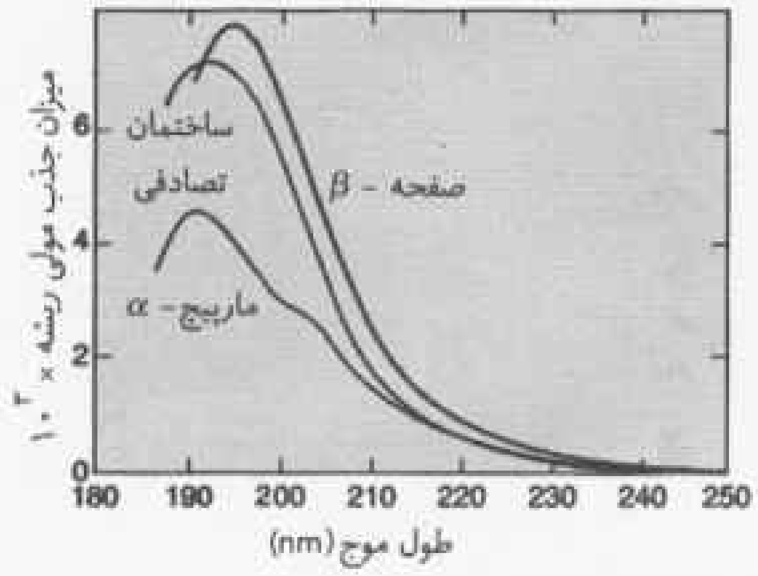


شکل ۷۴-۳ طیـف جـذب مـاوراءبنفش پروتئین گلبولی α-کیموتریپسین.

1. Far- UV 2. Exciton system 3. Molar absorbancy



شکل ۷۵-۳ جذب ماوراءبنفش برای کروموفورهای Phe، Tyr، Trp، و تیروزینات. به تفاوت در ضرایب خاموشی در محور چپ برای کروموفورهای مختلف توجه کنید.

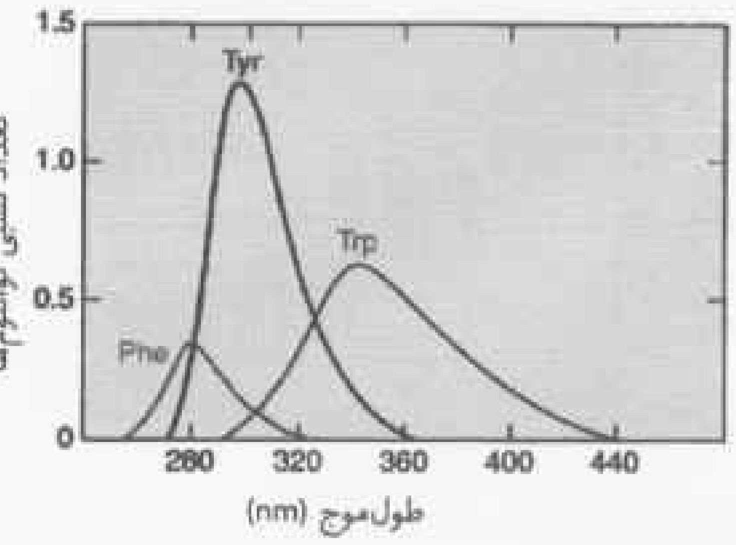


شکل ۷۶-۳ جذب ماوراءبنفش پیوندهای پپتیدی یک زنجیر پلی‌پپتیدی در کونفورماسیون‌های مارپیچ - α، ساختمان تصادفی، و صفحه - β موازی ناهمسو.

اسپکتروسکوپی فلورسانس

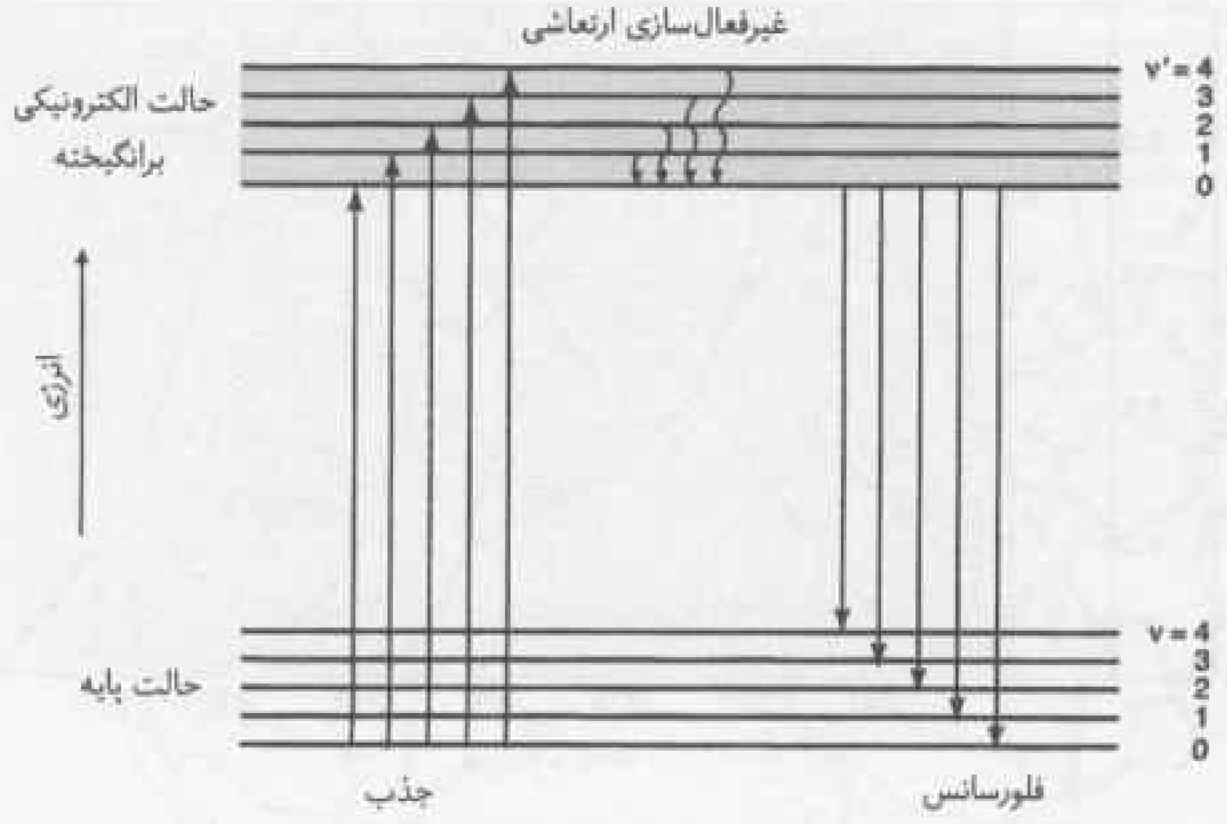
در بیشتر موارد، انرژی یک الکترون برانگیخته[1] که با جذب نور حاصل شده است، طی یک فرایند تصادمی[2] به‌صورت انرژی حرارتی از دست می‌رود. در برخی کروموفورها، انرژی برانگیختگی[3] با فلورسانس از بین می‌رود. **نشر فلورسنت**[4] همیشه طول‌موج نوری بزرگتری (انرژی کمتری) نسبت به طول‌موج جذبی فلوروفور دارد و به همین ترتیب سطوح انرژی ارتعاشی[5] که طی جذب نور (برانگیختگی) حاصل می‌شود، قبل از فلورسانس از دست می‌رود (شکل ۷۷-۳). در صورتی که ملکول دیگری برای جذب انرژی نشریافته توسط **فلوروفور** وجود داشته باشد، فلورسانس نشریافته مشاهده نمی‌شود و در عوض به ملکول جذب‌کننده منتقل می‌گردد. این ملکول پذیرنده به‌نوبه خود یا فلورسانس مشخص خود را نشر می‌دهد و یا انرژی برانگیختگی را با فرایند دیگری از دست می‌دهد. در صورتی که **ملکول پذیرنده** انرژی برانگیختگی خود را طی یک فرایند غیرفلورسنت ازدست دهد، یک خاموش‌کننده[6] فلورسانس **ملکول دهنده** می‌باشد. کارایی **انتقال برانگیختگی** بستگی به فاصله بین و جهت ملکول‌های دهنده و گیرنده دارد.

طیف‌های نشری فلورسانس مربوط به زنجیرهای جانبی فنیل‌آلانین، تیروزین، و تریپتوفان در شکل ۷۸-۳ نشان داده شده‌اند. طول‌موج‌های نشری فنیل‌آلانین با طول موج‌های جذب تیروزین همپوشانی دارند. به‌نوبه‌خود، طول‌موج‌های نشری تیروزین با طول موج‌های جذبی تریپتوفان همپوشان هستند. به‌دلیل این همپوشانی‌ها در طول موج‌های نشری و جذبی، اساساً تنها فلورسانس تریپتوفان مشاهده می‌گردد. انتقال‌های برانگیختگی



شکل ۷۸-۳ فلورسانس مشخص گروه‌های آروماتیک موجود در پروتئین‌ها.

1. Excited
2. Collision process
3. Excitation energy
4. Fluorescent emission
5. Vibrational energy
6. Quencher



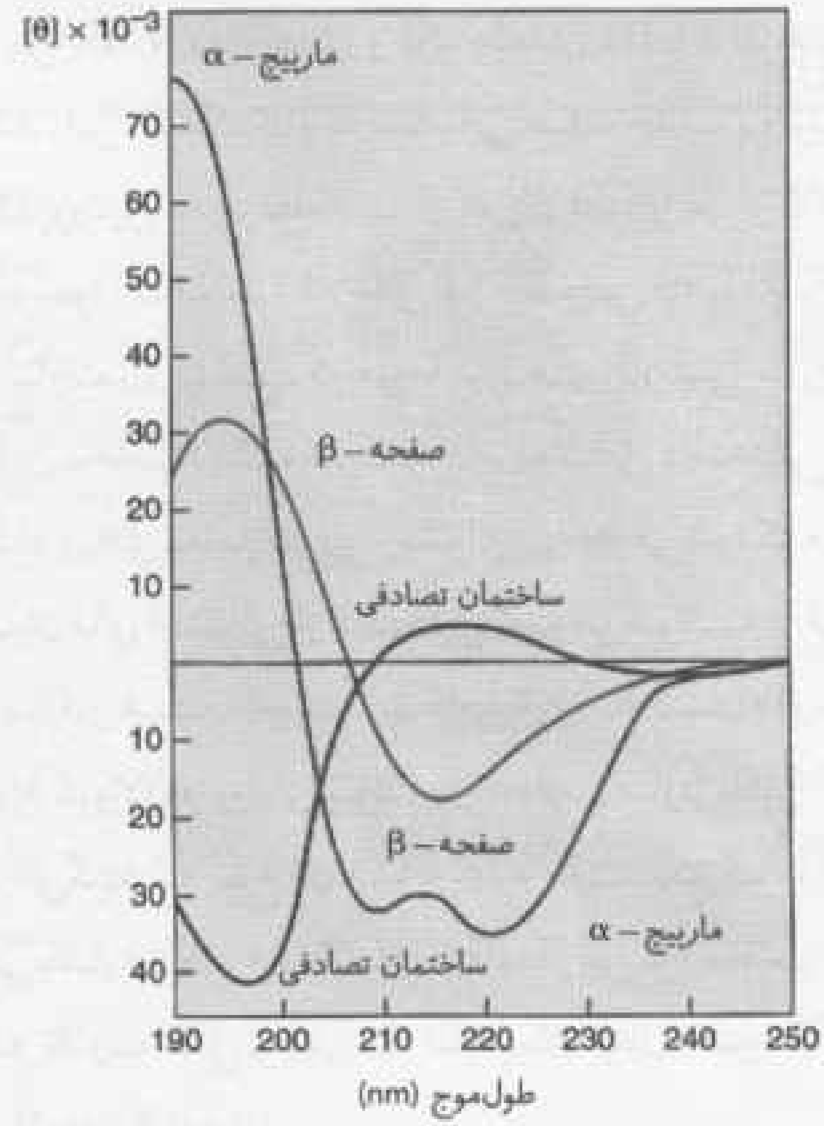
شکل ۷۷-۳ تغییرات الکترونیکی فلورسانس و جذب. برانگیختن در اثر جذب نور، از سطح ارتعاشی صفر در حالت پایه تا سطوح ارتعاشی مختلف بالاتر در حالت برانگیخته می‌باشد. نشر فلورسانس از سطح ارتعاشی صفر در حالت الکترونیکی برانگیخته تا سطوح ارتعاشی برانگیخته در حالت پایه است. نشر فلورسانس در طول موج بالاتر (انرژی کمتر) از طول موج جذب صورت می‌گیرد.

در فواصل تا ۸۰Å انجام می‌شوند که قطر شاخص دومن‌های گلبولی است. با دناتوراسیون، فواصل بین گروه‌های دهنده و پذیرنده افزایش یافته و کارایی انتقال انرژی به تریپتوفان کاهش می‌یابد. بر همین اساس، با دناتوراسیون یک پروتئین، افزایش فلورسانس تیروزین و یا فنیل‌آلانین و کاهش فلورسانس تریپتوفان مشاهده می‌گردد. از آنجایی‌که فرایندهای انتقال برانگیختگی در پروتئین‌ها وابسته به فاصله و جهت هستند، راندمان فلورسانس وابسته به کونفورماسیون پروتئین می‌باشد. با این نوع آنالیز امکان جستجوی تغییرات حاصل از تغییرات کونفورماسیونی و تعاملات اتصالی وجود دارد.

اسپکتروسکوپی دی‌کرومیسم حلقوی

دی‌کرومیسم حلقوی [1] (CD) حاصل تفاوت‌هایی در جذب نوری بین بردارهای در جهت عقربه‌های ساعت و در خلاف عقربه‌های ساعت یک پرتوی نور پولاریزه در هنگام عبور از میان یک محلول حاوی ملکول دارای فعالیت نوری نظیر یک L-آمینو اسید است. وقتی دی‌کرومیسم حلقوی طی یک دامنه طول موج تعیین می‌شود، یک طیف حاصل می‌شود. اسیدهای آمینه آروماتیک موجود در یک پروتئین و زنجیر پلی‌پپتیدی تولید یک چرخش نوری و طیف CD می‌کنند (شکل ۷۹-۳). به‌دلیل تفاوت‌های موجود در بین طیف‌های مربوط به ساختمان‌های مارپیچی α، صفحه β و تصادفی، دی‌کرومیسم حلقوی یک آزمون نسبتاً حساس برای میزان و نوع ساختمان دوم بوده است و معمولاً برای پیگیری تاشدن و دناتوراسیون پروتئینی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

1. Circular dichromism



شکل ۷۹-۳ طیف‌های دی‌کرومیسم حلقوی برای زنجیرهای پلی‌پپتیدی با کونفورماسیون‌های مارپیچ – α، صفحه – β، و تصادفی.

رزونانس مغناطیسی هسته[1]

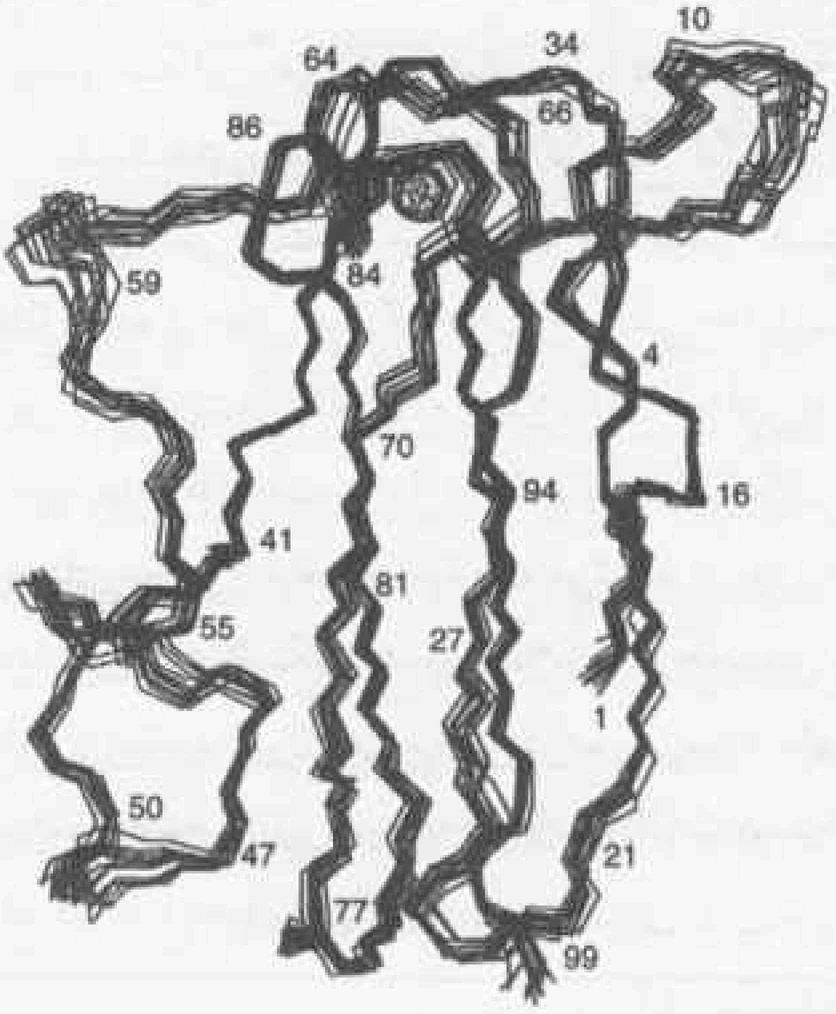
با NMR **دو-بُعدی (2-D)** و اسپکترومترهای قوی NMR می‌توان کونفورماسیون پروتئین‌های کوچک با حدود ۱۵۰ اسید آمینه یا کمتر را در محلول تعیین نمود. NMR چند بُعدی و رزونانس سه‌تایی[2] می‌تواند حساسیت را به بیش از ۲۵۰ ریشه گسترش دهد.

تکنیک‌های مرسوم NMR از تشعشع فرکانس‌رادیویی[3] **(rf)** برای مطالعه محیط هسته‌های اتمی استفاده می‌کنند که مغناطیسی هستند. نیاز به هسته‌های مغناطیسی مطلق بوده و متکی بر یک حالت چرخشی جفت‌نشده[4] می‌باشد. لذا اتم‌های فراوان کربن (^{12}C)، نیتروژن (^{14}N)، و اکسیژن (^{16}O) جذبی ندارند، در حالی‌که ^{13}C، ^{15}N، و ^{13}C جذب دارند. اطلاعات حاصل از باندهای جذبی امکان تعیین یکسانی[5] و تعداد نزدیک‌ترین گروه‌های مجاور را فراهم می‌سازد که می‌توانند بر روی پاسخ گونه‌های جذب‌کننده از طریق تعاملات پیوندی اثر بگذارند، ولی اطلاعاتی در خصوص تعاملات از طریق فضا (غیرپیوندی)[6] ناشی از کونفورماسیون بومی پروتئین فراهم نمی‌سازد. برای تعیین از طریق تعاملات فضایی و ساختمان سوم پروتئین، نیاز به استفاده از اثرات هسته‌ای اُورهازر[7] **(NOEs)** و به کارگیری تکنیک دو-بُعدی می‌باشد.

1. Nuclear magnetic resonance
2. Triple resonance
3. Redioferquency radiation
4. Unpaired spin state
5. Identity
6. Through-spcae (nonbonded) interaction
7. Nuclear Overhauser effects

تفاوت اصلی بین NMR دو-بُعدی و تک-بُعدی (1-D)، افزودن یک تأخیر زمانی دوم پالس rf می‌باشد. این تکنیک نیاز به شناسایی طیف جذب پروتونی از یک موقعیت خاص در ساختمان پروتئین دارد. تعاملات از طریق فضا را می‌توان در حداکثر فاصله حدود ۵Å مشاهده نمود. بـا تولید اطلاعاتی در خصوص فاصله بـرای جفت‌های بین ریشه‌ای از طریق ساختمان پروتئین، کونفورماسیون‌های پروتئینی سازگار با این طیف‌ها تولید می‌شوند. در این محاسبه، یک ماتریکس فاصله شامل دامنه‌هایی از فواصل (حداقل و حداکثر) برای تعداد زیادی تعاملات بین ریشه‌ای ساخته می‌شود که ممکن است اندازه‌گیری شوند. ساختمان‌های احتمالی از داده‌هایی تهیه می‌شوند که با فشارهای موجود بر طیف‌های NMR سازگار هستند. اصلاحات کامپیوتری ساختمان‌های محاسبه‌شده اولیه می‌تواند فواصل پیوند کووالان و زوایای پیوندی را مطلوب سازد. با این روش خانواده‌ای از ساختمان‌ها تولید می‌گردد که تنوع آن نشانه عدم دقت تکنیک یا «بی‌نظمی» پویای ساختمان تاشده می‌باشد (شکل ۸۰-۳). با استفاده از این نوع محاسبات، ساختمان‌هایی حاصل شده‌اند که تفاوت قابل‌توجهی با ساختمان زمان-متوسط[1] مشاهده‌شده در روش‌های انکسار اشعه-X ندارند.

سایـر تمهیدات NMR بـرای تعیین ساختمان پـروتئین، شامل تـوانایی در سنتز پروتئین‌هایی که حاوی اسیدهای آمینه غنی از ایزوتوپ (برای مثال حاوی 13C یا 15N) هستند و تولید معرف‌های جابه‌جایی پارامغناطیسی جهت مطالعه محیط‌های لوکالیزه بر رزونانس‌های پارامغناطیسی نظیر گروه‌های یون-گزارشگر لانتانیدی[2] می‌باشند.



شکل ۸۰-۳ ساختمان NMR پلاستوسیانین از لوبیای فرانسوی. این ساختمان هشت ساختمان قرارگرفته بر روی هم از اسکلت پلی‌پپتیدی پروتئین مذکور را نشان می‌دهد که از فشارهای طیف NMR محاسبه شده‌اند.

1. Time averaged structure
2. Lanthanide ion-reporting groups

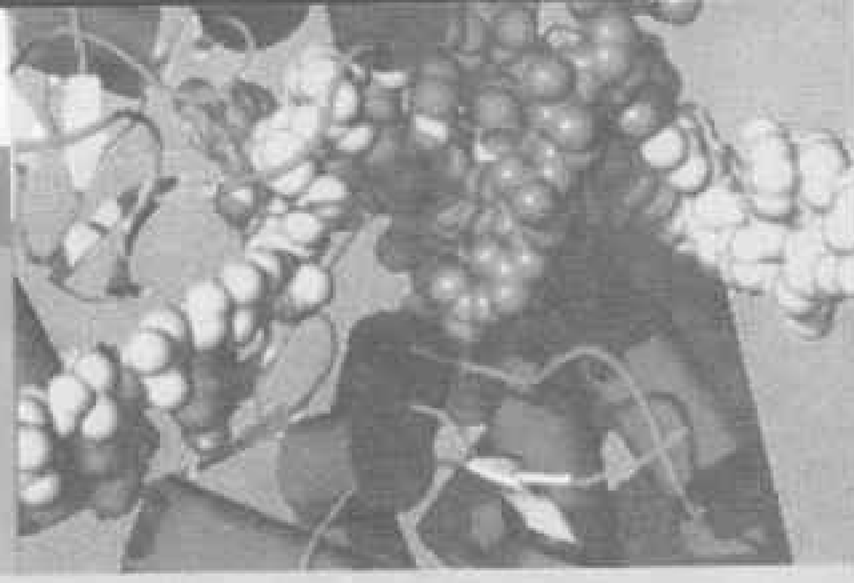
واژه‌های کلیدی

اسیدهای آمینه معمول
اسیدهای آمینه مشتق‌شده
اسیدهای آمینه بازی
سلنوسیستئین
پلی‌پپتید
پپتید
ساختمان اول
اسیدهای آمینه اسیدی
معادله هندرسن-هاسلباخ
pH ایزوالکتریک (pI)
pK'a

زویتریون
تعامل آبگریز
جایگزینی حفظ‌شده
هُمولوژی
ریشه ثابت
جایگزینی غیرحفظ‌شده
ساختمان دوم
کونفورماسیون بومی
پیوند فی (ϕ)
پیوند سای (ψ)
ساختمان چهارم

پیوند هیدروژنی
مارپیچ -α
فولد پروتئینی
موتیف ساختمانی
ساختمان -β
ساختمان سوم
پروتئین ذاتاً بی‌ساختمان
پروتئین گلبولی (کروی)
اینتراکتوم
خانواده پروتئینی
سوپرفولد

پروتئین فیبری (رشته‌ای)
مارپیچ پلی‌پرولینی نوع II
گلیکوپروتئین
آپوپروتئین
لیپوپروتئین
اتصال N-گلیکوزیدی
اتصال O-گلیکوزیدی
چاپرون
گلبول گداخته
چاپرونین
تعامل یونی



۴



همانندسازی، نوترکیبی و ترمیم DNA

مفاهیم کلیدی

- همانندسازی، نوترکیبی و ترمیم DNA مستلزم ترانس استریفیکاسیون، جابه‌جایی پارتنرها در عرض یک پیوند فسفودی‌استری، است. هر سه فرایند وابسته به ایجاد جفت باز مکمل هستند.
- برای همانندسازی DNA نیاز به یک الگو، مجموعه‌ای از آنزیم‌ها، و پیش‌سازهای مناسب است. این فرایند نیمه‌حفظ شده است، رشته‌های مادری طوری جدا می‌شوند که هر کدام می‌تواند به‌عنوان الگویی برای سنتز یک رشته مکمل عمل کند. مارپیچ دو رشته در چنگال همانندسازی باز شده و به دنبال آن یک مرحله پرایمینگ، افزودن متوالی نوکلئوتیدهای مکمل، و اتصال قطعات مجاور به یکدیگر رخ می‌دهد. این فرایند صحت فوق‌العاده‌ای دارد.
- همانندسازی در باکتری‌ها و سلول‌های پستانداران بسیار مشابه است، ولی تفاوت‌های موجود امکان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مهار انتخابی رشد باکتری را فراهم می‌سازد.
- همانندسازی به عنوان بخشی از چرخه سلولی، شدیداً تحت تنظیم قرار دارد. تلومراز از دو انتهای کروموزوم حفاظت می‌کند.
- نوترکیبی برای تفکیک کروموزومی به داخل سلول‌های دختر لازم است. اتصال هالیدی یکی از ترکیبات واسط کلیدی ساختمانی DNA در این فرایند است. خطاهای نوترکیبی می‌توانند منجر به سرطان شوند.
- تغییر یک جفت باز از ۶ میلیارد جفت باز موجود در ژنوم انسانی می‌تواند منجر به بیماری شود. برآورد می‌شود که DNA هر سلول روزانه در معرض ۵۰,۰۰۰-۱۰,۰۰۰ رخداد آسیب‌رسان، نظیر اشعه و واکنش‌های شیمیایی قرار دارد. مکانیسم‌های متعدد مختلفی برای ترمیم DNA آسیب‌دیده وجود دارد. ترمیم برداشت بازی و ترمیم برداشت نوکلئوتیدی، فرایندهای بسیار صحیحی هستند که باز(های) آسیب‌دیده را برداشت می‌کنند. نقص در مکانیسم‌های ترمیم DNA می‌تواند منجر به سرطان شود.
- برخی مکانیسم‌های ترمیمی به قیمتی به سلول امکان برخورد با آسیب مهارکننده همانندسازی را می‌دهند که در داخل DNA ایجاد خطا کنند.

۱-۴ • خصوصیات مشترک همانندسازی، نوترکیبی و ترمیم

در هنگام بررسی «سه R» مربوط به DNA، شامل همانندسازی[1]، نوترکیبی[2] و ترمیم[3]، اشاره به برخی شباهت‌های موجود در بین آنها مفید می‌باشد. مکانیسم‌های پایه همانندسازی، رونویسی و ترمیم طی دوره تکامل حفظ شده‌اند. از آنجایی‌که این فرایندها بر روی یک سوبسترا، زنجیرهای DNA، انجام می‌شوند، مکانیسم‌های شیمیایی پایه مشترکی برای ایجاد و تجزیه پیوندهای فسفودی‌استری دارند. شیمی DNA به میزان زیادی مرتبط با شیمی پیوندهای فسفودی‌استری آن است. موضوع حمله نوکلئوفیلی به یک پیوند فسفودی-استری که سبب جابه‌جایی پارتنرها در عرض پیوند می‌شود، در هر سه فرایند مشترک است. ماهیت دو-رشته DNA سلولی و مکمل‌بودن دو رشته نیز نقش اساسی در هر سه فرایند دارد. از آنجایی اطلاعات ژنتیکی در دو نسخه وجود دارند، هر رشته می‌تواند به‌عنوان الگویی برای سنتز یا ترمیم رشته مخالف مورد استفاده قرار گیرد. در تمامی فرایندهایی که بر روی DNA انجام می‌شوند، ماهیت موازی ناهمسوی دو رشته بسیار مهم است. این سه فرایند آنزیم‌های مشترک متعددی دارند. هرچند، نیاز به صحت و تنظیم سبب شده تا گروه‌های آنزیمی برای یک وظیفه خاص تخصص پیدا کنند. با شناسایی شباهت‌ها و تفاوت‌ها، درک همانندسازی، نوترکیبی و ترمیم راحت‌تر می‌شود.

به‌عنوان حامل اطلاعات ژنتیکی، DNA موجود در یک سلول می‌بایست دو برابر شده، حفظ شود و با صحت فوق‌العاده به سلول‌های دختر انتقال داده شود. اندازه کار بزرگ است. باکتری معمول *Escherichia coli* (*E.coli*) ژنومی با ۴٫۶ میلیون جفت باز (bp) دارد. ژنوم انسانی متشکل از دو نسخه از ۲۳ کروموزوم و در مجموع حدود $۶×۱۰^۹$ bp می‌باشد. هر کروموزوم مجزای انسانی شامل یک ملکول DNA با اندازه ۳۴ میلیون جفت باز در کوچکترین و ۲۶۳ میلیون جفت باز در بزرگترین آنها می‌باشد.

صحت کلی همانندسازی فوق‌العاده بالا می‌باشد: طی یک دوره همانندسازی، به‌طور متوسط تنها یک خطا در هر یک میلیارد جفت باز رخ می‌دهد. هرچند، حتی با این صحت فوق‌العاده، در هر تقسیم سلولی، تعدادی خطا به داخل سلول متوسط انسانی ارائه می‌شود. این خطاها شامل جهش‌ها می‌باشند که خود تغییرات قابل وراثت در توالی DNA هستند. جهش‌ها اغلب مضر هستند؛ آنها می‌توانند بر روی قابلیت زیست سلول تأثیر بگذارند و یا رشد کنترل‌نشده‌ای را سبب شوند که مشخصه سرطان است. برخی بیماری‌های جدی می‌توانند از تغییر یک جفت باز در $۶×۱۰^۹$ bp ژنوم انسانی حاصل شوند. اوکاریوت‌ها وظیفه دیگری را در خصوص تضمین همانندسازی تمامی قسمت‌های ژنوم تنها برای یکبار در هر چرخه سلولی دارند تا مانع ناهنجاری‌های کروموزومی و عدم تعادل در بیان ژن شوند.

---

1. Replication 2. Recombination 3. Repair

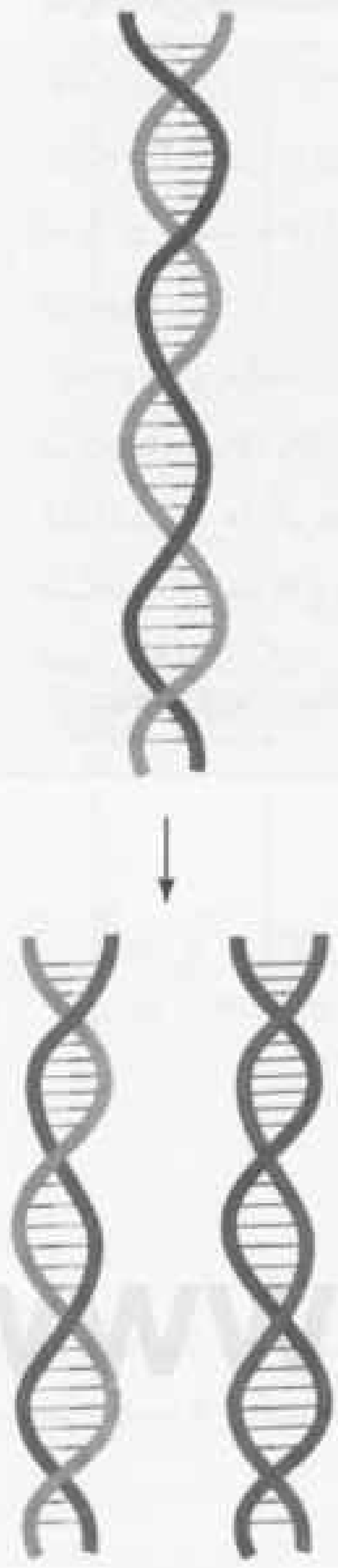
به دلیل اهمیت حیاتی، همانندسازی صحیح کافی نیست. **DNA** در معرض حملات مداوم توسط عوامل شیمیایی و فیزیکی، شامل آب، گونه‌های واکنشگر اکسیژن که محصولات فرعی متابولیسم طبیعی سلول هستند، مواد شیمیایی موجود در مواد غذایی و محیط، و تشعشع، قرار دارند. سیستم‌هایی وجود دارند که آسیب **DNA** را شناسایی و ترمیم می‌کنند و به موجب آن به حفظ سلامت ژنوم کمک می‌نمایند. برخلاف تمامی این مراقبت‌ها، تجمع جهش‌ها می‌توانند منجر به مرگ سلولی، افزایش سن و سرطان شوند.

۴-۲ • همانندسازی DNA: مکانیک پایه

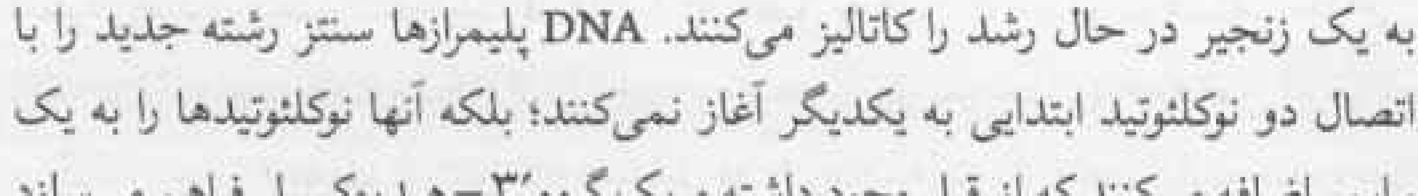
اصول پایه

همانندسازی با دو برابر نمودن **DNA**، سبب حفظ اطلاعات ژنتیکی می‌شود که به صورت توالی‌های بازی حمل می‌گردند. همانندسازی نیاز به یک **الگو**[1] برای فراهم‌سازی اطلاعات توالی دارد. به محض این که ساختمان دو-رشته مکمل **DNA** شناسایی شد، مکانیسم پایه همانندسازی **DNA** آشکار گردید. از آنجایی که هر رشته مکمل رشته دیگر است که در آن **A** موجود در یک رشته همیشه به **T** موجود در رشته دیگر و به همین ترتیب **C** با **G** جفت می‌شود، دو رشته می‌توانند از یکدیگر جدا شده و هر کدام به عنوان الگویی برای سنتز مکمل جدید مورد استفاده قرار گیرد. این فرایند را **همانندسازی نیمه حفظ‌شده**[2] گویند، زیرا نیمی از ملکول **DNA** (یک رشته) مادری در هر مارپیچ دورشته جدید حفظ و با رشته مکمل تازه سنتز جفت می‌شود (شکل ۱-۴).

یک الگو به تنهایی برای سنتز **DNA** کافی نیست. **DNA پلیمرازها** افزودن منونوکلئوتیدها به یک زنجیر در حال رشد را کاتالیز می‌کنند. **DNA** پلیمرازها سنتز رشته جدید را با اتصال دو نوکلئوتید ابتدایی به یکدیگر آغاز نمی‌کنند؛ بلکه آنها نوکلئوتیدها را به یک پرایمر اضافه می‌کنند که از قبل وجود داشته و یک گروه ′۳-هیدروکسیل فراهم می‌سازد (شکل ۲-۴، جدول ۱-۴). همان‌طور که به‌واسطه توانایی **RNA پلیمرازها** در شروع سنتز زنجیرهای پلی‌نوکلئوتیدی *از ابتدا*[3] (بدون پرایمر) نشان داده می‌شود، نیاز به یک پرایمر به دلیل شیمی تشکیل پیوند فسفودی‌استری نیست. از آنجایی که در هنگام پلیمریزاسیون چند نوکلئوتید ابتدایی، تعداد کمی جفت باز برای تثبیت مارپیچ دورشته وجود دارد که خود



شکل ۱-۴ سنتز نیمه‌حفظ‌شده DNA. دو رشته مادری جدا شده و هر کدام به‌عنوان یک الگو برای سنتز یک رشته دختر مکمل مورد استفاده قرار می‌گیرد. لذا دو دورشته دختری، هر کدام حاوی یک رشته مادری و یا رشته تازه سنتز، تولید می‌گردد.



شکل ۲-۴ الگو و پرایمر. سوبسترا برای افزودن یک نوکلئوتید، پرایمری است که با الگو ایجاد پیوند هیدروژنی کرده است. الگو اطلاعات مورد نیاز برای تعیین نوکلئوتیدی را فراهم می‌کند که باید اضافه شود. پرایمر یک گروه ′۳-هیدروکسیل آزاد فراهم می‌کند که به آن می‌توان نوکلئوتیدها را افزود. دو رشته موازی ناهمسو هستند.

1. Template 2. Semiconservative 3. De novo

جدول ۱-۴ • نیازهای مربوط به همانندسازی DNA

الگو	اطلاعات توالی را فراهم می‌کند
پرایمر	OH–′۳ آزادی را فراهم می‌کند که به آن نوکلئوتیدها اضافه می‌شود.
پیش‌سازها	′۵ – داکسی‌نوکلئوزید تری‌- فسفات‌ها (S′–dNTPs)
آنزیم‌ها	DNA پلیمرازها، گیره‌های لغزشی، هلیکازها، پرایمازها پروتئین‌های اتصالی DNA تک- رشته، نوکلئازها، لیگازها

برای فراهم‌سازی شرایط شناسایی ایجاد جفت باز صحیح لازم می‌باشد، غلط‌گیری[1] (ص ۱۹۲) احتمالاً غیرمؤثر است. در اکثر موجودات، پرایمر ابتدایی توسط آنزیمی به‌نام **پرایماز** از ریبونوکلئوتیدها ساخته می‌شود. این چند نوکلئوتید ابتدایی برای برداشت نهایی علامت‌دار می‌شوند، زیرا از جنس ریبونوکلئوتید هستند؛ با برداشت بعدی این ریبونوکلئوتیدها، شکافی[2] به‌وجود می‌آید که می‌تواند با صحت بیشتری دوباره سنتز شود، زیرا سنتز مجدد با طویل‌سازی یک رشته بلندتر DNA صورت می‌گیرد. در هنگام رشد زنجیر DNA، خود زنجیر در حال رشد که با الگو ایجاد جفت باز کرده است، به عنوان پرایمری برای افزودن نوکلئوتیدهای بعدی عمل می‌کند.

شیمی طویل‌سازی زنجیر

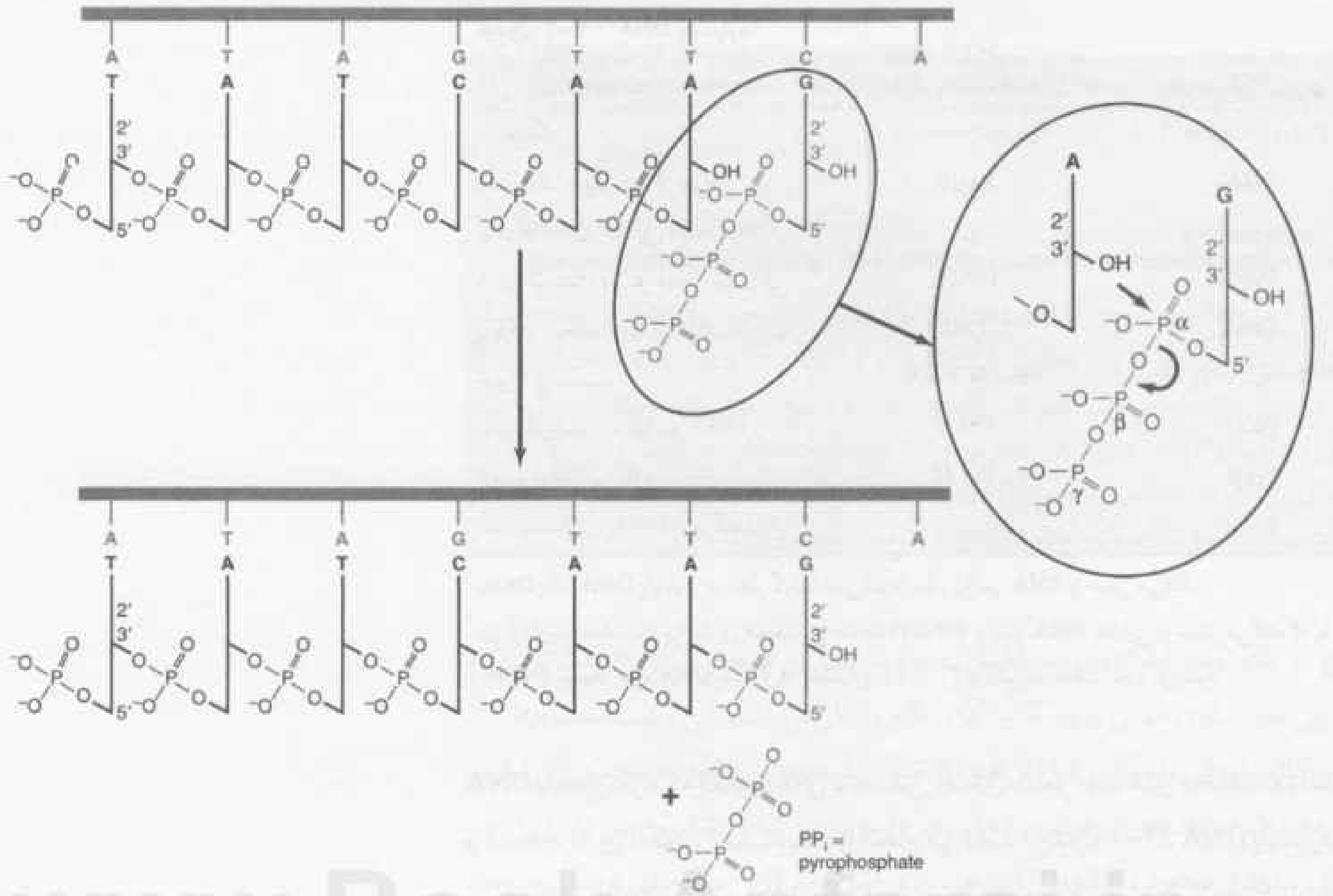
شیمی همانندسازی، ترمیم و نوترکیبی DNA بیشتر مربوط به شیمی **پیوندهای فسفودی‌استری** است که نوکلئوتیدهای مجاور موجود در یک زنجیر DNA را به یکدیگر متصل می‌کنند. تولید یک پیوند فسفودی‌استری بین یک زنجیر کوتاه DNA (یک **پرایمر**) و نوکلئوتید ورودی در شکل ۳-۴ نشان داده شده است. برای اضافه‌شدن هر نوکلئوتید به زنجیر در حال رشد، این فرایند تکرار می‌شود.

افزودن یک نوکلئوتید به یک زنجیر در حال رشد، یک فرایند خود به‌خودی نیست، زیرا آنتروپی به‌میزان زیادی کاهش می‌یابد. به‌همین دلیل، پیش‌سازهای نوکلئوتیدی DNA شامل ′۵ – داکسی‌ریبونوکلئوزید تری‌فسفات‌ها (′۵–dNTPs) می‌باشند (ارتباط بالینی ۱-۴). گروه ′۳ – هیدروکسیل زنجیر DNA در حال رشد، حمله نوکلئوفیلی را به پیوند فسفودی‌استری متصل‌کننده اولین فسفات (α؛ متصل به کربن ′۵ قند) و دو فسفات خارجی (β و γ) انجام می‌دهد (شکل ۳-۴). این پیوند هیدرولیز نمی‌شود، بلکه **ترانس استریفیه** می‌گردد؛ پیوند فسفودی‌استری که فسفات α را به فسفات β متصل کرده بود، حالا فسفات α را به انتهای ′۳ زنجیر در حال رشد اضافه می‌کند. دو فسفات انتهایی به‌صورت پیروفسفات معدنی آزاد می‌شوند که توسط فسفودی‌استرازهای موجود در سلول‌ها هیدرولیز می‌گردد. با تجزیه پیروفسفات، واکنش اساساً غیرقابل‌برگشت می‌شود. شیمی همانندسازی، ترمیم و نوترکیبی عمدتاً مستلزم واکنش‌های ترانس‌استریفیکاسیون می‌باشد.

DNA پلیمرازها

DNA پلیمرازها افزودن نوکلئوتیدها در طی مرحله طویل‌سازی زنجیر را انجام می‌دهند. این آنزیم‌ها نیاز به **الگو** و **پرایمر** دارند و از پیش‌سازهای ′۵–dNTPs استفاده می‌کنند (شکل ۳-۴). تکنیک‌های بسیار قوی تعیین توالی DNA و واکنش زنجیری پلیمراز (ص ۳۴۷) برای پلیمریزاسیون DNA متکی بر الگو و پرایمر هستند. سلول‌ها چندین

1. Proofreading 2. Gap



شکل ۳-۴ تولید یک پیوند فسفودی‌استری. نوکلئوزید تری‌فسفات ورودی که پیوندهای هیدروژنی صحیح را با الگو در جایگاه فعال یک DNA پلیمراز ایجاد می‌کند با رنگ ارغوانی نشان داده شده است. گروه ′۳ – هیدروکسیل پرایمر به داخلی‌ترین (α) فسفات حمله کرده و جایگزین دو فسفات انتهایی به صورت پیروفسفات (تصویر گوشه) می‌شود. نتیجه افزایش طول پرایمر به اندازه یک نوکلئوتید است. این چرخه تا زمان دسترسی به الگو، ادامه می‌یابد.

ارتباط بالینی ۴-۱

هدف شیمی درمانی می‌تواند پیش‌سازهای سنتز DNA باشد

به دلیل این که سلول‌های توموری، سرعت همانندسازی بیشتری نسبت به اکثر بافت‌های طبیعی دارند، شیمی‌درمانی بیشتر بر روی مهار همانندسازی DNA متمرکز می‌باشد. در مقایسه با سلول‌های ساکن، حساسیت سلول‌های دارای همانندسازی فعال، نسبت به این داروها بیشتر می‌باشد که خود یک پنجره درمانی را به‌وجود می‌آورد. علاوه بر سلول‌های سرطانی که تقسیم سریعی دارند و اهداف شیمی‌درمانی هستند، به‌طور طبیعی سلول‌هایی با تقسیم سریع در مجرای روده، مغز استخوان و فولیکول‌های مو وجود دارند؛ حساسیت این سلول‌های طبیعی که تقسیم سریعی دارند، بسیاری از اثرات جانبی محدودکننده شیمی‌درمانی را توجیه می‌کند.

یکی از راه‌های مهار همانندسازی، ایجاد تداخل در مخازن داکسی‌ریبونوکلئوتیدهایی است که برای سنتز DNA مورد نیاز هستند. هیدروکسی اوره یک آنتی‌متابولیت است که ریبونوکلئوتید ردوکتاز را مهار می‌کند که آنزیم کلیدی مورد نیاز برای تولید داکسی ریبونوکلئوتیدها از ریبونوکلئوتیدها می‌باشد. نتیجه کاهش dNTPها و در نتیجه مهار سنتز DNA، بدون داشتن اثر بر روی NTPهای مورد نیاز برای رونویسی، می‌باشد. از هیدروکسی اوره اساساً در برابر ملانوم و بیماری‌های میلوپرولیفراتیو نظیر لوسمی میلوژنی مزمن استفاده می‌شود؛ این دارو همچنین می‌تواند همراه با درمان تشعشعی به‌کار رود که به DNA آسیب می‌رساند و به‌دلیل کاهش مخازن dNTP، همچنین می‌تواند مانع ترمیم DNA شود. اثر جانبی اصلی سرکوب میلوژنی به‌دلیل مهار سنتز DNA در مغز استخوان می‌باشد که منجر به کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون، گلبول‌های سفید خون و پلاکت‌ها می‌شود.

جدول ۲-۴ • DNA پلیمرازها

عملکرد	آنزیم *E.coli*	آنزیم اوکاریوتی
پرایمینگ	DnaG primase[1]	Pol α/primase[2]
سنتز رشته پیوسته (رهبر)	PolIII	Polδ
سنتز قسمت ابتدایی قطعه اوکازاکی		polα/primase
سنتز قسمت بیشتر قطعه اوکازاکی	Pol III	Polδ
پرکردن شکاف بعد از برداشت پرایمر	PolI	Polδ
عبور از آسیب	PolIV, PolV	Polϵ, Polξ, Polη, Polι
عبور از آسیب، ترمیم DNA	Pol II	Polϵ?
ترمیم برداشت بازی	Pol II	Polβ
همانندسازی DNA میتوکندریایی	—	Polγ

[1] DnaG یک DNA پلیمراز در نظر گرفته نمی‌شود؛ یک پرایمر RNA را سنتز می‌کند.

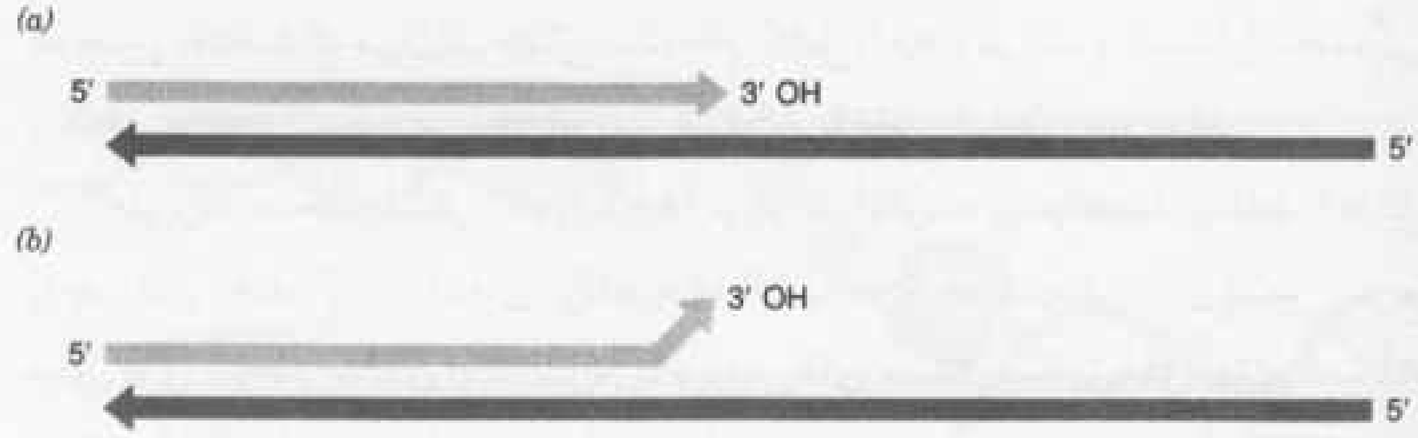
[2] در اوکاریوت‌ها، جزء پرایمازی کمپلکس Pol α/Primase پرایمر RNA ابتدایی را سنتز می‌کند که با استفاده از dNTPs توسط جزء DNA پلیمراز α به‌اندازه ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتید امتداد داده می‌شود.

DNA پلیمراز دارند که فعالیت‌های تخصص یافته‌ای، شامل جنبه‌های مختلف همانندسازی و نسخه‌برداری الگوی آسیب‌دیده، را انجام می‌دهند (جدول ۲-۴). DNA پلیمرازهایی که در همانندسازی شرکت می‌کنند، به دو طریق به تضمین صحت کمک می‌کنند: انتخاب ابتدایی نوکلئوتید صحیحی که قرار است اضافه شود و انجام غلط‌گیری آنزیمی.

انتخاب ابتدایی براساس قرارگیری نوکلئوتید ورودی در داخل جایگاه فعال پلیمراز است. نوکلئوتید ورودی که پیوندهای هیدروژنی مناسبی را با نوکلئوتید موجود در رشته الگو برقرار می‌کند، می‌تواند به زنجیر در حال رشد اضافه شود. نوکلئوتید ورودی که پیوند هیدروژنی صحیحی را به‌وجود نمی‌آورد، به شکل مناسبی در محل برای کاتالیز قرار نمی‌گیرد. تغییرات کونفورماسیونی در خود DNA پلیمراز برای تضمین این صحت بحرانی است که منجر به میزان خطا در دامنه 10^{-4} تا 10^{-6} می‌شود. با وجود این که این میزان برای اکثر فرایندها مناسب است، ولی میزانی نیست که برای همانندسازی مورد نیاز می‌باشد.

راه دوم برای افزایش صحت توسط DNA پلیمرازها، **غلط‌گیری** است. این عمل توسط یک **فعالیت ′۳ به ′۵ اگزونوکلئولیتیک** انجام می‌شود که نوکلئوتیدهای بدجفت‌شده[1] را از انتهای ′۳ زنجیر در حال رشد برداشت می‌کند. غلط‌گیری بخش ذاتی بسیاری از DNA پلیمرازهای همانندساز است، ولی همچنین ممکن است توسط یک پروتئین همراه در کمپلکس همانندسازی انجام شود. پرایمری با یک نوکلئوتید انتهایی که به شکل مناسبی ایجاد جفت باز کرده است، سوبسترای خوبی برای افزودن نوکلئوتید بعدی است، ولی به‌عنوان یک سوبسترای ضعیف برای فعالیت ′۳ به ′۵ –اگزونوکلئازی می‌باشد (شکل ۴-۴).

1. Mispaired



شکل ۴-۴ غلط‌گیری. (a) وقتی نوکلئوتید مناسب به انتهای ۳' یک پرایمر اضافه می‌شود، نتیجه یک سوبسترای خوب برای افزودن یک نوکلئوتید است که برای فعالیت ۳' به ۵' اگزونوکلئازی یک سوبسترای ضعیف می‌باشد. (b) در موارد نادر، وقتی یک نوکلئوتید غلط به پرایمر اضافه می‌شود، پرایمر حاصل که یک بدتطابق در انتهای ۳' دارد، سوبسترای ضعیفی برای افزودن یک نوکلئوتید است، ولی برای فعالیت اگزونوکلئازی ۳' به ۵' غلط‌گیری سوبسترای خوبی است که نوکلئوتید بدتطابق را برداشت می‌کند. بدین ترتیب پرایمر کوتاه‌تر می‌شود، ولی آماده قرارگیری نوکلئوتید صحیح می‌گردد.

پرایمری که یک نوکلئوتید انتهایی بدتطابق[1] دارد، سوبسترای ضعیفی برای افزودن نوکلئوتید است، ولی سوبسترای خوبی برای ۳' به ۵' -اگزونوکلئاز می‌باشد. این ترکیب سبب برداشت تمامی نوکلئوتیدهای بدتطابق قبل از افزودن نوکلئوتید بعدی می‌شود. همچنین این ترکیب منجر به برداشت تعدادی از نوکلئوتیدهایی می‌شود که به شکل مناسبی در داخل زنجیر در حال رشد قرار داده شده‌اند، ولی این هزینه‌ای است که لازم است برای افزایش صحت حاصل از غلط‌گیری پرداخت شود. زمانی که زنجیر در حال رشد بسیار کوتاه است، توانایی در تمایز بین نوکلئوتیدهای قرارگرفته مناسب و غلط کاهش می‌یابد، زیرا قدرت ایجاد جفت باز بین یک زنجیر کوتاه و الگو ضعیف است. احتمالاً این بهترین توجیه برای تکامل DNA پلیمرازها بدون قابلیت شروع از ابتدای زنجیر، و استفاده از ریبونوکلئوتیدها برای آغاز سنتز DNA می‌باشد.

صحت همانندسازی چند DNA پلیمراز جهش‌یافته واقعاً بیش از پلیمراز طبیعی است. حال اگر تصور شود افزایش صحت یک مزیت تکاملی است، پس این موضوع می‌تواند متناقض باشد. هر چند، دلایلی وجود دارند که براساس آنها می‌توان انتظار داشت که صحت بیش از یک حد خاص، مزیت نبوده و در حقیقت ممکن است یک عیب باشد. اول، غلط‌گیری فوق‌العاده صحیح از نظر انرژی پرهزینه است. برای اطمینان از برداشت تمامی بازهایی که به غلط در داخل زنجیر قرار داده شده‌اند، پلیمراز می‌بایست تعداد زیادی از بازهایی را برداشت کند که به‌واسطه نوسانات حرارتی طبیعی، نسبت به الگو قدری حرکت کرده‌اند. این موضوع سبب می‌شود تا همانندسازی به میزان زیادی آهسته شده و بیشتر انرژی را به شکل dNTPs مصرف کند. دوم، توانایی سیستم‌های ترمیم DNA در عمل با خطاهای باقیمانده سبب کاهش مزایای حتی پلیمرازهای صحیح‌تر می‌گردد.

1. Mismatch

همچنین معتقدند که میزان کم جهش، ماده خام تکامل را فراهم می‌کند و سبب تولید جمعیتی با مقداری تنوع ژنتیکی می‌شود که بهتر می‌تواند با تغییر شرایط زنده بماند.

علی‌رغم صحت بسیار بالا، پلیمرازها می‌توانند آنالوگ‌های نوکلئوتیدی غلط را داخل زنجیر قرار دهند. از آنالوگ‌های نوکلئوتیدی اغلب در شیمی درمانی برای کشتن سریع سلول‌های سرطانی دارای رشد سریع یا ویروس‌های مسئول بیماری‌های جدی استفاده می‌شود. آنالوگ‌هایی که به نوکلئوتیدها فسفریله می‌شوند، می‌توانند در داخل **DNA** قرار داده شوند که نتیجه آن می‌تواند مهار ادامه سنتز یا میزان بالای جهش می‌باشد. تفاوت‌های موجود در بین پلیمرازهای باکتریایی یا ویروسی و پلیمرازهای میزبان از نظر توانایی خود در قراردادن آنالوگ‌های نوکلئوتیدی می‌تواند یک پنجره درمانی را باز کند که از طریق آن پزشکان می‌توانند ترجیحاً سلول‌های عفونت‌یافته را هدف قرار دهند (ارتباط بالینی ۲-۴).

جداسازی رشته‌های مادری: چنگال همانندسازی

پروکاریوت‌ها و اوکاریوت‌ها به شکل اساساً مشابهی مشکلات همانندسازی را حل می‌کنند.

ارتباط بالینی ۲-۴

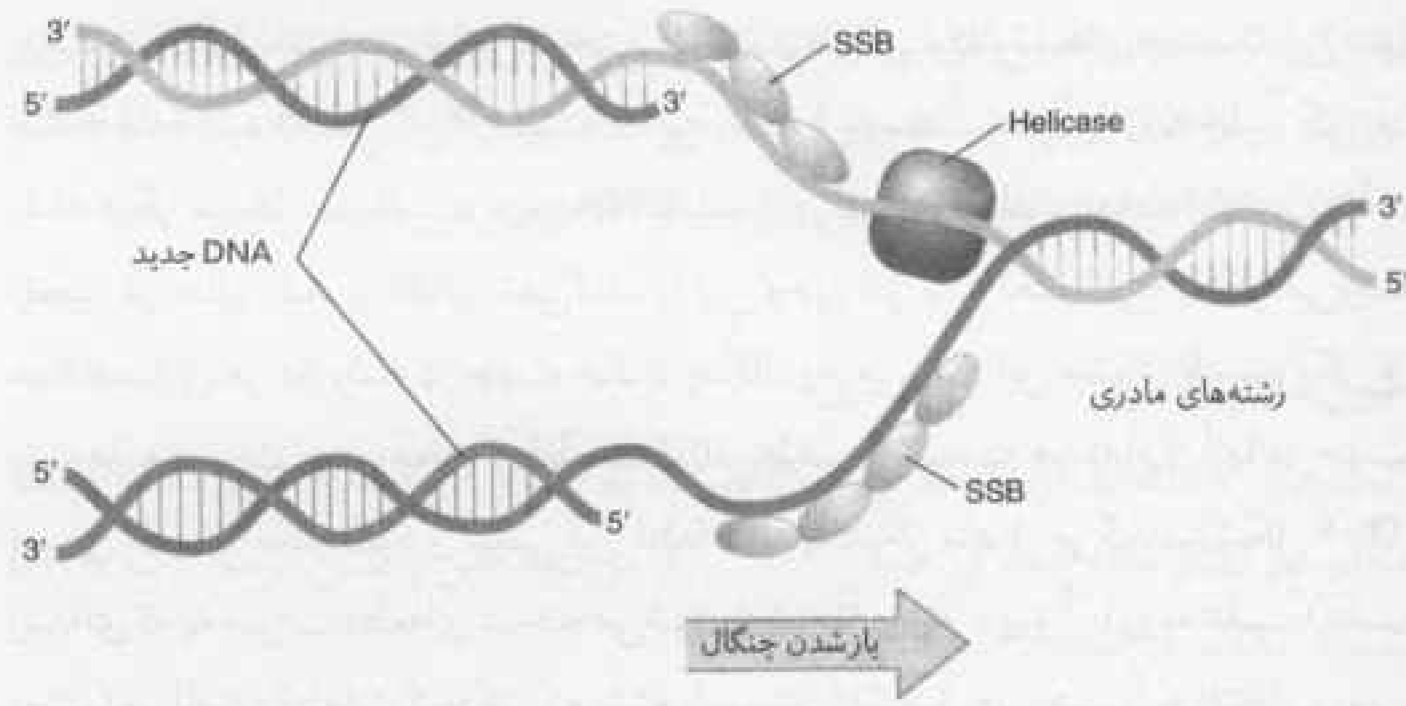
آنالوگ‌های نوکلئوتیدی و مقاومت دارویی در درمان HIV

سندروم نقص ایمنی اکتسابی (ایدز) در اثر ابتلاء به عفونت ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) حاصل می‌شود. یک مرحله کلیدی در چرخه زندگی HIV، سنتز یک نسخه DNA از ژنوم RNA ویروس می‌باشد که توسط یک ترانس‌کریپتاز معکوس کاتالیز می‌شود. ترانس‌کریپتاز معکوس هدف اصلی شیمی‌درمانی است، زیرا سلول‌های طبیعی نیازی به آن ندارند.

زیدووُدین[1] (AZT؛ ′۳-آزیدو-′۳،′۲-دی‌داکسی‌تیمیدین) اولین دارویی بود که برای درمان عفونت HIV مورد تأیید قرار گرفت. این دارو یک آنالوگ نوکلئوزیدی با یک گروه آزیدو بر روی قند می‌باشد. AZT می‌تواند به شکل تری‌فسفات فسفریله شود که برای قرارگیری در داخل رونوشت معکوس با dTTP رقابت می‌کند. بعد از قرارگیری، به دلیل این که گروه آزیدو بر روی کربن ′۳ قند سوبسترایی برای افزودن نوکلئوتید نمی‌باشد، رشد زنجیر رونوشت خاتمه می‌پذیرد. DNA پلیمرازهای سلولی که صحت بالاتری دارند، به میزان بسیار کمتری تحت تأثیر AZT قرار می‌گیرند که خود یک پنجره درمانی به‌وجود می‌آورد که در آن اثر دارو اساساً بر روی همانندسازی ویروس می‌باشد. با این وجود اثرات جانبی شامل سمّیت برای مغز استخوان که حاوی سلول‌های با تقسیم سریع است و میوپاتی می‌باشند؛ میوپاتی احتمالاً به دلیل سمّیت برای میتوکندری‌هایی است که DNA پلیمراز خود، polδ، را دارند. از آنالوگ‌های نوکلئوزیدی دیگر نیز برای درمان عفونت HIV استفاده شده است. دیدانوزین[2] (DDI؛ ′۳،′۲ دی‌داکسی اینوزین) و زالسیتابین[3] (دی‌داکسی سیتیدین) نیز بعد از این که مشتقات فسفریله آنها توسط ترانس‌کریپتاز HIV در داخل زنجیر قرار داده شدند، سبب خاتمه می‌شوند.

ترانس‌کریپتازهای معکوس فاقد غلط‌گیری هستند، لذا میزان خطای آنها بسیار بیشتر از DNA پلیمرازهای سلولی است. درمان ایدز بواسطه این خطاها پیچیده‌تر می‌شود، زیرا جمعیت‌های ویروسی موجود در یک فرد، جهش‌های متعددی را دارند و با گذشت زمان میزان جهش‌ها افزایش می‌یابد. احتمالاً برخی از این جهش‌ها نسبت به هر نوع عامل درمانی مقاوم هستند. لذا بسیاری از داروهایی که در ابتدا بار ویروسی را کاهش می‌دهند، بعداً به دلیل رشد انتخابی ویروس‌هایی که هدف دارویی در آنها به شکل غیرحساس جهش یافته است، بی‌تأثیر می‌شوند. درمان ترکیبی با چندین دارو که پروتئین‌های ویروسی مختلفی را هدف می‌گیرند، تلاشی برای غلبه بر این مشکل است.

1. Zidovudine 2. Didanosine 3. Zalcitabine



شکل ۵-۴ جدایی رشته‌های مادری در محل چنگال همانندسازی. سنتز DNA در ساختمانی به‌نام چنگال همانندسازی رخ می‌دهد که در آن رشته‌های مادر جدا می‌شوند. یک هلیکاز برای جدایی رشته‌های مادری و فراهم‌سازی امکان پیشرفت چنگال مورد نیاز است. پروتئین‌های اتصالی به DNA تک‌رشته (SSBs) برای جدا نگه‌داشتن رشته‌ها مورد نیاز هستند. رشته‌های مادری حول یکدیگر در هر ۱۰/۵ جفت باز پیچیده و می‌بایست برای جدا شدن، باز شوند؛ نتیجه بازشدن پیچ‌ها، ایجاد مشکلات توپولوژیک است. توجه داشته باشید که انتهای ′۳ یکی از رشته‌های در حال رشد به سمت چنگال است، در حالی‌که برای رشته دیگر، انتهای ′۵ آن به سمت چنگال می‌باشد.

جداسازی دو رشته مادری DNA به هر کدام از آنها این امکان را می‌دهد تا به‌عنوان یک الگو برای سنتز یک رشته مکمل جدید عمل کنند. با جداسازی رشته‌های مادر، ساختمانی به‌نام **چنگال همانندسازی** به‌وجود می‌آید (شکل ۵-۴). برای این جداسازی نیاز به میزان قابل توجهی انرژی می‌باشد. ذوب‌شدن DNA دو-رشته به دو تک رشته تنها در درجه حرارت‌های بالا (بیش از ۹۰°C) رخ می‌دهد. برای جداسازی رشته‌های مادری در درجه حرارت‌های فیزیولوژیک، سلول‌ها از آنزیم‌هایی به‌نام **هلیکاز** استفاده می‌کنند. هلیکازها به DNA تک-رشته اتصال یافته و در یک جهت ثابت در طول آن حرکت می‌کنند که در هر مرحله آن نیاز به هیدرولیز ATP می‌باشد. به این ترتیب، دو رشته DNA مادری از یکدیگر جدا شده و چنگال همانندسازی تشکیل می‌شود (شکل ۵-۴).

در غیاب پروتئین‌های دیگر، رشته‌های مادری سریعاً در پشت سر هلیکاز دوباره به یکدیگر متصل می‌شوند، زیرا رشته‌های مکمل نزدیک هستند و به شکل مناسبی کنار یکدیگر قرار دارند. **پروتئین‌های اتصالی DNA تک-رشته**[1] **(SSBs)** مانع اتصال مجدد این رشته‌ها به یکدیگر می‌شوند. SSBها رشته‌ها را جدا از یکدیگر نگه می‌دارند، ساختمان دوم بالقوه را کاهش می‌دهند (مارپیچ‌ها ممکن است مانع پلیمریزاسیون شوند) و رشته‌های الگو را برای سنتز سریع DNA به صف در می‌آورند. SSBها نه تنها در همانندسازی، بلکه همچنین در نوترکیبی و ترمیم اهمیت دارند.

حل مشکل قطبیت: سنتز نیمه-ناپیوسته DNA

رشته‌های موازی ناهمسو در چنگال همانندسازی یک مشکل اساسی را برای فرایند همانندسازی به‌وجود می‌آورند؛ رشته‌های دختر طوری قرار دارند که در یکی از آنها انتهای ′۳ و در

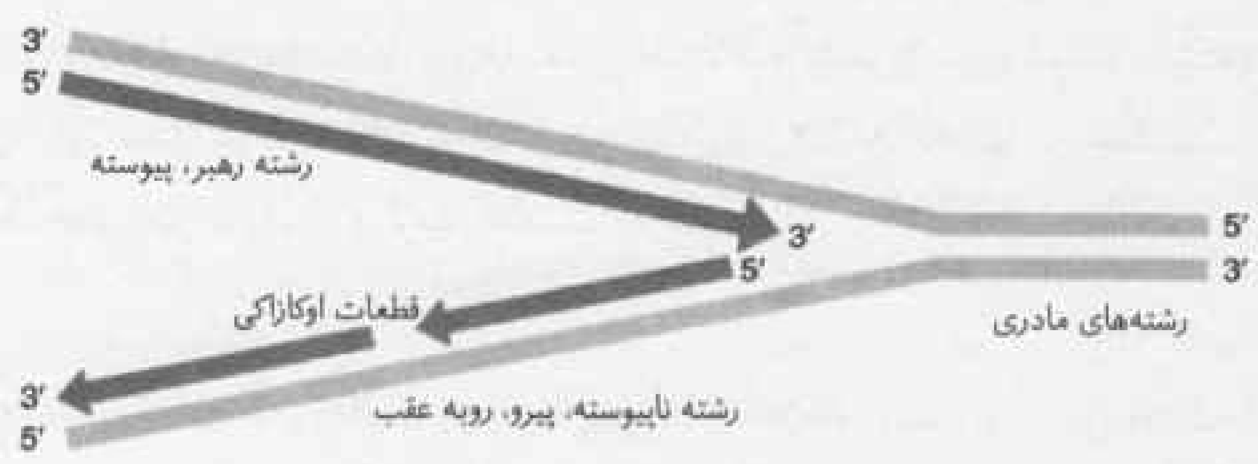
1. Single-stranded DNA-binding proteins

دیگری انتهای ′۵ به سمت چنگال می‌باشد (شکل ۵-۴). رشته‌ای که ′۳ - هیدروکسیل آن به سمت چنگال است می‌تواند به راحتی با افزودن متوالی نوکلئوتیدهای جدید به این انتها امتداد داده شود (شکل ۳-۴ را ببینید)؛ این رشته را **پیوسته**[۱]، **رهبر**[۲] یا **روبه جلو**[۳] گویند. رشته دیگر مشکل‌ساز است: هیچ DNA پلیمرازی افزودن نوکلئوتیدها به انتهای ′۵ یک زنجیر در حال رشد را کاتالیز نمی‌کند. با این وجود در یک نگاه کلی، به‌نظر می‌رسد همانندسازی هر دو رشته در جهت حرکت چنگال رخ می‌دهد. این مشکل با سنتز یکی از رشته‌ها به صورت مجموعه‌ای از قطعات کوتاه برطرف می‌شود که هر کدام از آنها در جهت طبیعی ′۵ به ′۳ سنتز شده و سپس این قطعات به یکدیگر متصل می‌گردند (شکل ۶-۴). رشته‌ای که به صورت قطعه‌ای ساخته می‌شود را رشته **ناپیوسته**[۴]، **پیرو**[۵] یا **روبه عقب**[۶] (عقب رونده) می‌نامند؛ قطعات کوچکی که رشته ناپیوسته را تشکیل می‌دهند را به افتخار ریجی اوکازاکی[۷] که این فرایند را تشریح نمود، **قطعات اوکازاکی**[۸] می‌نامند. طول قطعات اوکازاکی در انسان حدود ۱۳۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید است. طول این قطعات در *E.coli* تقریباً ۱۰ برابر بزرگتر است. کل فرایند را **نیمه- ناپیوسته** گویند، زیرا یک‌رشته به صورت پیوسته و رشته دیگر به صورت ناپیوسته سنتز می‌شود.

حرکت چنگال همانندسازی

پرایمینگ

DNA پلیمرازها نیاز به پرایمر دارند. **رشته پیوسته** (رهبر) نیاز به تنها یک حادثه پرایمینگ (تولید پرایمر) دارد که طی مرحله شروع همانندسازی رخ می‌دهد (ص ۲۱۱). در حالی‌که هر قطعه اوکازاکی رشته ناپیوسته (روبه عقب، پیرو) نیاز به پرایمر مجزایی دارد. این پرایمرها قطعات کوتاهی از RNA هستند که توسط آنزیم اختصاصی به‌نام **پرایماز** سنتز می‌شوند. در



شکل ۶-۴ حل مشکل قطبیت، سنتز نیمه ناپیوسته DNA هر دو رشته در حال رشد از انتهای ′۳ خود امتداد داده می‌شوند. رشته‌ای که انتهای ′۳ آن در جهت چنگال است، به‌شکل پیوسته رشد می‌کند؛ این رشته را رشته پیوسته یا رهبر گویند. از آنجایی‌که DNA پلیمرازی برای افزودن نوکلئوتیدها به انتهای ′۵ زنجیر در حال رشد وجود ندارد، رشته‌ای که انتهای ′۵ آن در جهت چنگال است، به‌شکل مجموعه‌ای از قطعات کوتاه، تحت عنوان قطعات اوکازاکی، هر کدام در جهت ′۵ به ′۳ سنتز شده و سپس این قطعات به یکدیگر اتصال داده می‌شوند. این را رشته ناپیوسته، رو به عقب یا پیرو گویند.

1. Continuous 2. Leading 3. Anterograde 4. Discontinuous
5. Lagging 6. Retrograde 7. Reiji Okazaki 8. Okazaki fragments

سلول‌های اوکاریوتی، پرایمرهای RNA حدوداً ۸ تا ۱۰ نوکلئوتید طول دارند. این پرایمرها یک گروه ′۳- هیدروکسیل فراهم می‌کنند که اولین داکسی‌ریبونوکلئوتید می‌تواند به‌طریق کووالان به آن اتصال یابد (شکل ۷-۴). لذا هر قطعه اوکازاکی یک قطعه کوتاه RNA را در انتهای ′۵ خود دارد که به‌طور کووالان به DNA متصل می‌باشد.

طویل‌سازی زنجیر

زنجیرهای DNA با افزودن تکراری نوکلئوتیدها به انتهای ′۳- OH زنجیرها، به‌واسطه مکانیسم نشان داده شده در شکل ۳-۴، رشد می‌کنند. این واکنش توسط یک DNA پلیمراز کاتالیز می‌شود.

برداشت پرایمر

پرایمرهای RNA توسط آنزیم‌های دارای فعالیت **RNA هیبریداز (RNase H)** برداشت می‌شوند. RNase H هیدرولیز یک زنجیر RNAای را کاتالیز می‌کند که از طریق پیوندهای هیدروژنی به یک زنجیر DNA اتصال یافته است (یعنی، یک هیبرید RNA-DNA). در اوکاریوت‌ها، یک آندونوکلئاز اختصاصی آویخته[1] (FEN1) نیز در این فرایند همکاری دارد؛ FEN1 برشی[2] را در یک خمیدگی ایجاد می‌کند که در آن قسمت RNA از الگو جدا شده است. تمامی ریبونوکلئوتیدها برداشت شده و تنها DNA باقی می‌ماند.

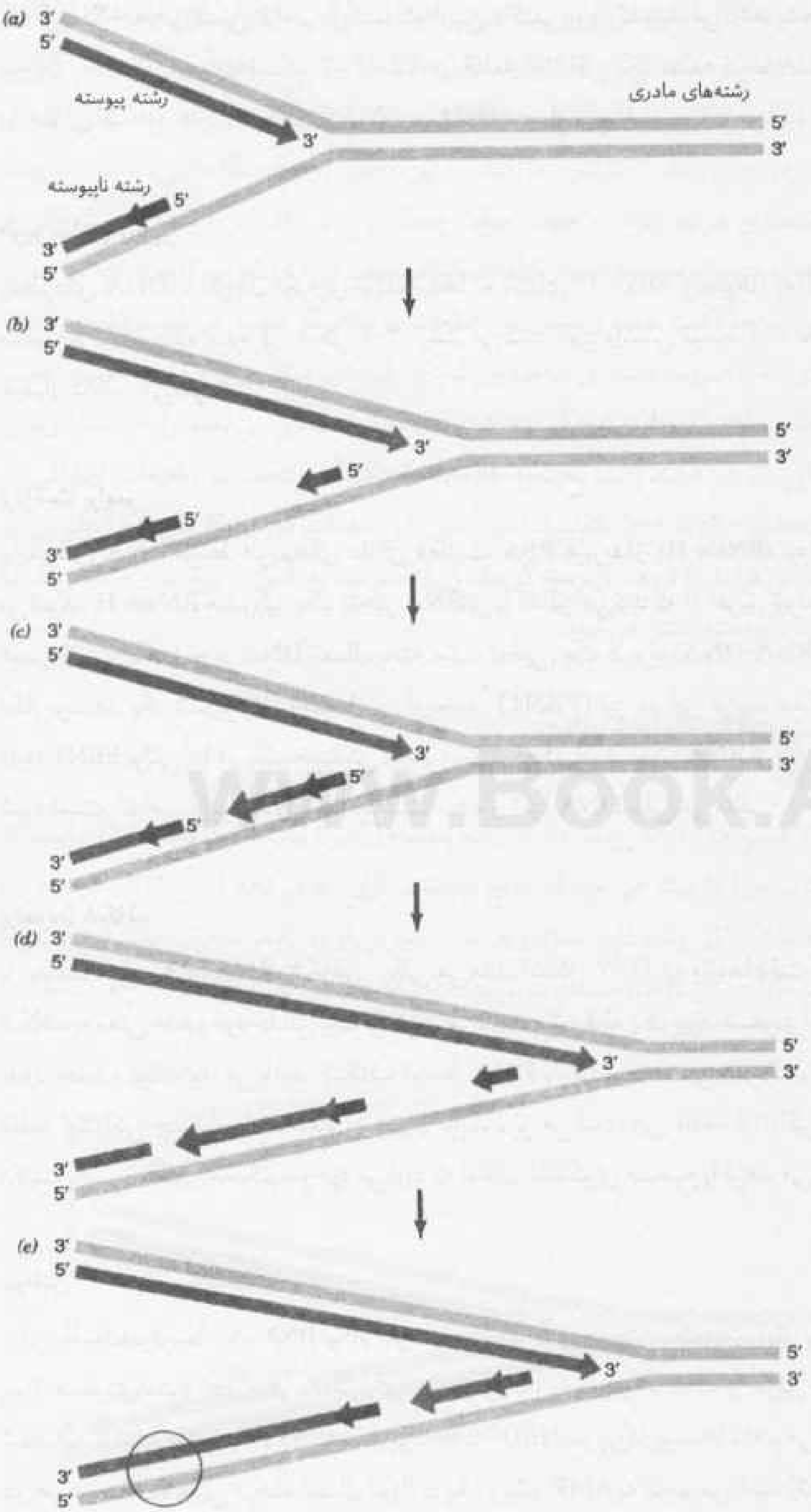
پرنمودن شکاف

با برداشت پرایمرهای RNA، **شکافی**[3] باقی می‌ماند (شکل ۷-۴). به واژه‌ها دقت کنید: شکاف به معنی عدم وجود حداقل یک نوکلئوتید می‌باشد. برش قطع یک پیوند فسفودی‌استری بدون حذف نوکلئوتید می‌باشد. شکاف توسط DNA پلیمراز با داکسی‌ریبونوکلئوتید و قطعه اوکازاکی جدیداً ساخته‌شده به عنوان پرایمر، پر می‌شود. این قطعه اوکازاکی یک ترکیب پرایمر- الگوی محکم به‌وجود می‌آورد که امکان غلط‌گیری صحیح را فراهم می‌سازد.

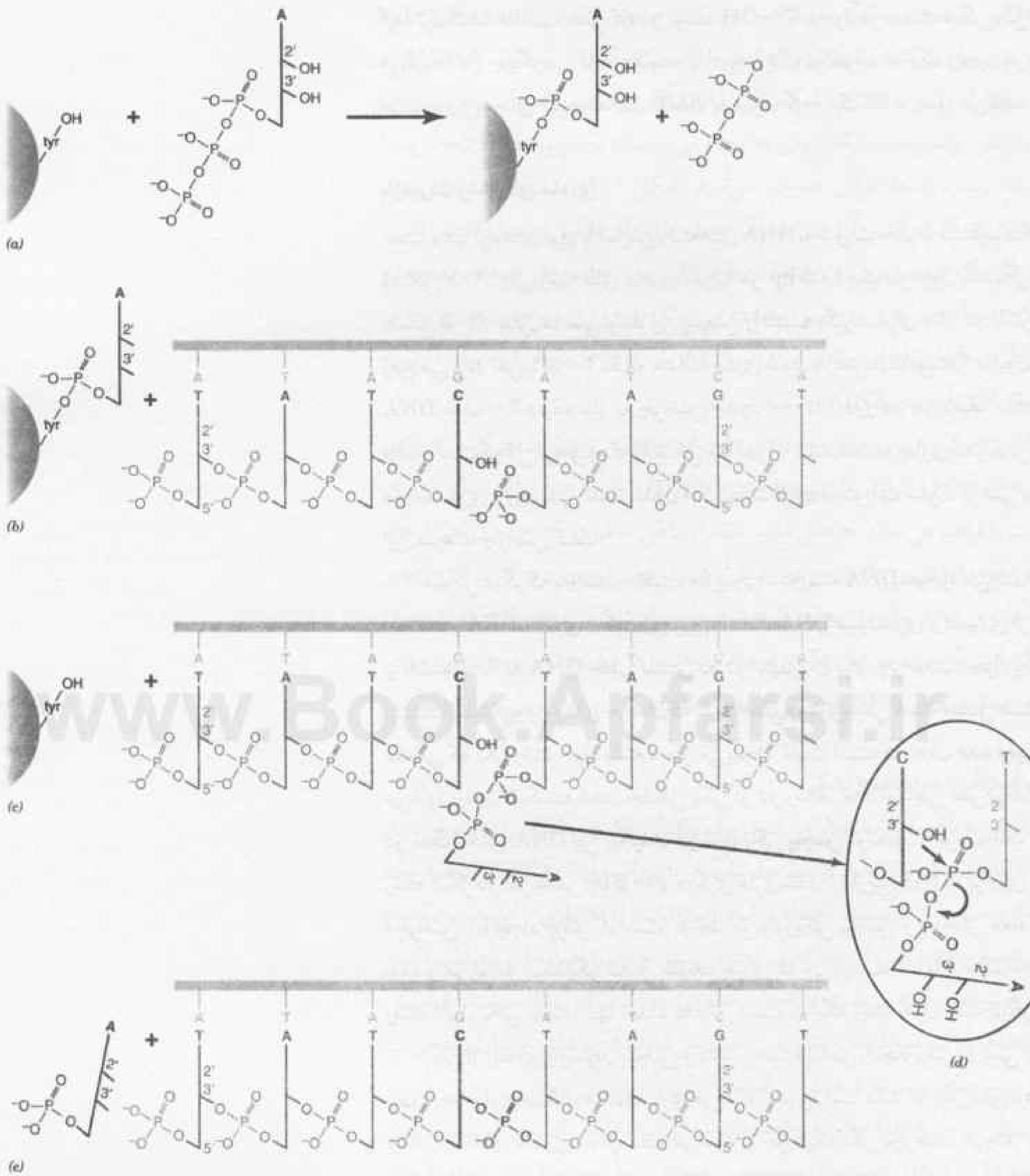
دوختن

برش باقیمانده توسط یک **DNA لیگاز** دوخته می‌شود. برای دوختن یک برش نیاز به یک پیوند فسفودی‌استری جدید می‌باشد. برای این منظور نیاز به انرژی است که از طریق جفت شدن این واکنش با تجزیه ATP در اوکاریوت‌ها یا NAD^+ در پروکاریوت‌ها فراهم می‌گردد. در هر دو حالت، اولین مرحله اتصال کووالان یک ریشه AMP به آنزیم می‌باشد (شکل- ۸-۴). سپس این AMP به انتهای ′۵ برش انتقال داده می‌شود. این AMP به‌عنوان یک

1. Flap endonuclease 2. Nick 3. Gap



شکل ۷-۴ سنتز DNA در چنگال همانندسازی. (a) رشته پیوسته از انتهای ′۳ با افزودن تکراری نوکلئوتیدها، به‌صورت نشان‌داده‌شده در شکل ۲-۴ امتداد داده می‌شود. یک قطعه اوکازاکی با یک پرایمر کوتاه RNA که قبلاً ساخته شده است، در سمت دیگر نشان داده شده است. (b) با استفاده از رشته مادر به عنوان الگو، پرایماز یک پرایمر RNA می‌سازد (ارغوانی). (c) DNA پلیمراز به‌طریق کووالان انتهای ′۳ پرایمر RNA را با قراردادن داکسی‌ریبونوکلئوتید (برنزه)، به‌صورت نشان داده شده در شکل ۲-۴، امتداد می‌دهد. (d) وقتی قطعه اوکازاکی در حال رشد به قطعه سنتزشده قبلی می‌رسد، پرایمر RNA موجود در قطعه قدیمی‌تر برداشت شده و شکاف توسط DNA پلیمرازی پر می‌شود که در حال امتداد قطعه اوکازاکی جدیدتر است. در این زمان، چنگال بیشتر باز شده و پرایماز، پرایمر جدیدی را سنتز می‌کند. (e) وقتی این شکاف پر شد و تنها یک برش باقی ماند، یک DNA لیگاز دو قطعه را به یکدیگر متصل می‌کند (داخل حلقه). این فرایند با امتداددادن پرایمر جدید، برداشت پرایمر قدیمی، پرکردن شکاف، و دوختن برش، تکرار می‌شود.



شکل ۸-۴   مکانیسم DNA لیگاز. (a) ابتدا DNA لیگاز افزودن یک ریشه AMP به یک ریشه تیروزین آنزیم را کاتالیز می‌کند. دهنده AMP در اوکاریوت‌ها ATP (همان‌طور که در اینجا نشان داده شده است به AMP و پیروفسفات تجزیه می‌شود) و در پروکاریوت‌ها NAD (تجزیه به AMP و NMN) است. (b) کمپلکس لیگاز-AMP به یک دورشته DNA بریده اتصال می‌یابد. (c) لیگاز AMP را به فسفات '۵ آزاد نوکلئوتید محل برش اضافه می‌کند. (d) عکس گوشه: گروه '۳-هیدروکسیل سمت دیگر برش به فسفات α نوکلئوتید در محل برش حمله کرده تا با ایجاد پیوند فسفودی‌استری جدید، اسکلت DNA را دوخته و AMP را آزاد کند. این حمله مشابه حمله‌ای است که طی سنتز DNA رخ می‌دهد (با شکل ۲-۴ مقایسه کنید)، ولی به جای پیروفسفات، AMP گروه ترک‌کننده است. (e) نتیجه پیوستگی اسکلت فسفودی‌استری، به «قیمت» تجزیه یک ملکول ATP به AMP و PPi (یا تجزیه NAD به AMP و NMN) است.

گروه ترک‌کننده مناسب عمل کرده و توسط $3'-OH$ موجود در سمت دیگر برش جایگزین می‌گردد؛ این جایگزینی قابل مقایسه با افزودن یک نوکلئوتید به یک زنجیر در حال رشد است، ولی به‌جای پیروفسفات، **AMP** به‌عنوان گروه ترک‌کننده عمل می‌کند.

بازنمودن رشته‌های مادری

بحث و دیاگرام‌های فوق با نمایش رشته‌های **DNA** به صورت خطوط مستقیم ساده می‌شود (شکل ۷-۴). ولی رشته‌های مادری تقریباً هر **۱۰٫۵ bp** یک بار حول یکدیگر می‌پیچند (شکل ۵-۴). سلول‌ها نمی‌توانند این پیچش را نادیده بگیرند. برای مثال در باکتری ***E.coli***، ژنوم می‌تواند تقریباً هر ۴۰ دقیقه همانندسازی شود. بازنمودن کامل ۴٫۶ میلیون جفت باز **DNA** ظرف ۴۰ دقیقه نیاز به چرخش حدود ۱۱,۰۰۰ دور در هر دقیقه[1] **(rpm)** دارد! واضح است که کل کروموزوم که به شکل متراکمی تا شده است و حاوی کمپلکس‌های بزرگ همانندسازی و رونویسی است، بدون حرکت کف کردن محتویات سلول، براحتی نمی‌تواند با این سرعت چرخش کند.

مشکل دیگر که به‌واسطه ماهیت مارپیچی - دورشته **DNA** به‌وجود می‌آید، توپولوژیک است. در **DNA** حلقوی (نظیر کروموزوم ***E.coli***، **DNA** میتوکندری و بسیاری از ویروس‌ها و پلاسمیدها) یا **DNA** خطی بلندی که دو انتهای آن برای چرخیدن[2] حول یکدیگر آزاد نیستند (نظیر کروموزوم‌های خودمان که در فواصلی به ماتریکس هسته متصل هستند)، تعداد دفعاتی که یک رشته حول رشته دیگر می‌پیچد[3] ثابت است که به آن **عدد ارتباطی**[4] گفته می‌شود. بدون شکسته شدن حداقل یکی از دو رشته، عدد ارتباطی نمی‌تواند تغییر کند. در ملکول‌های **DNA** این پیچیدن دو نوع، یکی **پیچش**[5] واتسون-کریک یک رشته حول رشته دیگر در تقریباً هر **۱۰٫۵ bp** و دیگری فنری‌شدن[6] مارپیچ دورشته بر روی محور خود (**چرخش**[7] **یا ایجاد ابرفنر**[8])، است. از نظر توپولوژیکی پیچش و چرخش معادل یکدیگر بوده و می‌توانند بیکدیگر تبدیل شوند؛ چیزی که می‌بایست تا زمان سالم‌ماندن هر دو رشته ثابت باقی بماند، تنها تعداد دفعاتی است که یک رشته حول رشته دیگر می‌پیچد.

یکی از راه‌های بازنمودن پیچش و کاهش عدد ارتباطی، ایجاد برش در یکی از رشته‌های مادری در جلوی چنگال همانندسازی می‌باشد. بدین‌ترتیب فشار توپولوژیکی برداشت شده و به رشته‌های مادری اجازه داده می‌شود تا حول یکدیگر بچرخند. هرچند وجود برش یک خطر جدی است، زیرا وقتی چنگال همانندسازی به این برش برسد، در اثر جداشدن رشته‌ها، این برش به یک شکست دورشته در **DNA** تبدیل می‌شود. یک شکست دو-رشته یک خطر جدی برای پایداری ژنوم است؛ در صورت عدم ترمیم، کشنده می‌باشد. آنزیم‌هایی تحت عنوان **توپوایزومراز** با کاتالیز تغییراتی در عدد ارتباطی که امکان بازشدن

1. Revolution per minute
2. Rotation
3. Wrap
4. Linking number
5. Twisting
6. Coiling
7. Writhing
8. Supercoiling

و نهایتاً جدایی رشته‌های مادری را فراهم می‌سازد، مشکل کاهش عدد ارتباطی را به شکل ایمن‌تری حل می‌کنند. توپوایزومرازها یک شکست موقتی در اسکلت DNA ایجاد می‌کنند و سپس آن را می‌دوزند. این شکستگی با هیدرولیز پیوند قند-فسفات رخ نمی‌دهد، بلکه طی واکنش ترانس‌استریفیکاسیونی به انجام می‌رسد که یک پیوند فسفات-آنزیم را به عنوان یک ترکیب واسط موقتی به‌وجود می‌آورد (شکل ۹-۴). با برقراری مجدد پیوند فسفودی‌استری اسکلت، آنزیم آزاد می‌شود. لذا حذف یا ایجاد خالص پیوند فسفودی‌استری رخ نداده و تنها یک نوع سوییچ در پارتنرها در عرض این پیوند حاصل می‌شود. این به معنی آن است که «ایجاد برش» و «دوختن مجدد» می‌تواند بدون نیاز به جفت‌شدن با یک ترکیب واسط پر-انرژی (برای مثال، هیدرولیز ATP یا NAD^+) انجام شود. بدین‌ترتیب از وجود برش‌های آزاد در DNA اجتناب می‌شود.

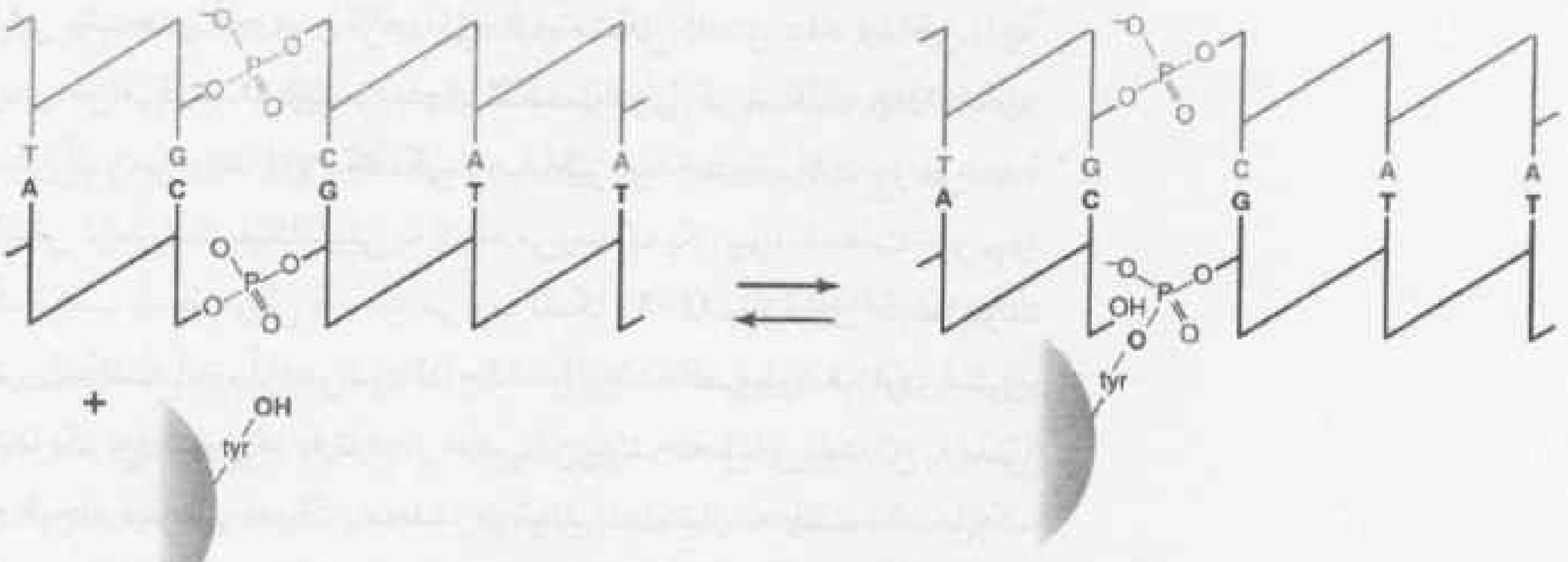
دو کلاس اصلی توپوایزومراز وجود دارد: توپوایزومرازهای نوع I یک شکست موقتی در یک رشته ایجاد کرده (تولید یک پیوند پروتئین-DNA) و اجازه عبور رشته دیگر از میان این شکست را فراهم می‌سازد. حاصل تغییر عدد ارتباطی به میزان یک عدد در هر مرحله می‌باشد. توپوایزومرازهای نوع II در هر دو رشته شکست موقتی به‌وجود می‌آورند (تا حدودی پله‌ای) و اجازه می‌دهند یک مارپیچ دورشته از میان محل شکست عبور کند که نتیجه آن تغییر عدد ارتباطی به اندازه دو عدد در هر مرحله می‌باشد. هر دو نوع توپوایزومراز، نقش‌های مهمی را در همانندسازی DNA بازی می‌کنند و اهداف مهمی برای شیمی‌درمانی هستند.

گیره‌های لغزشی و پیشروندگی

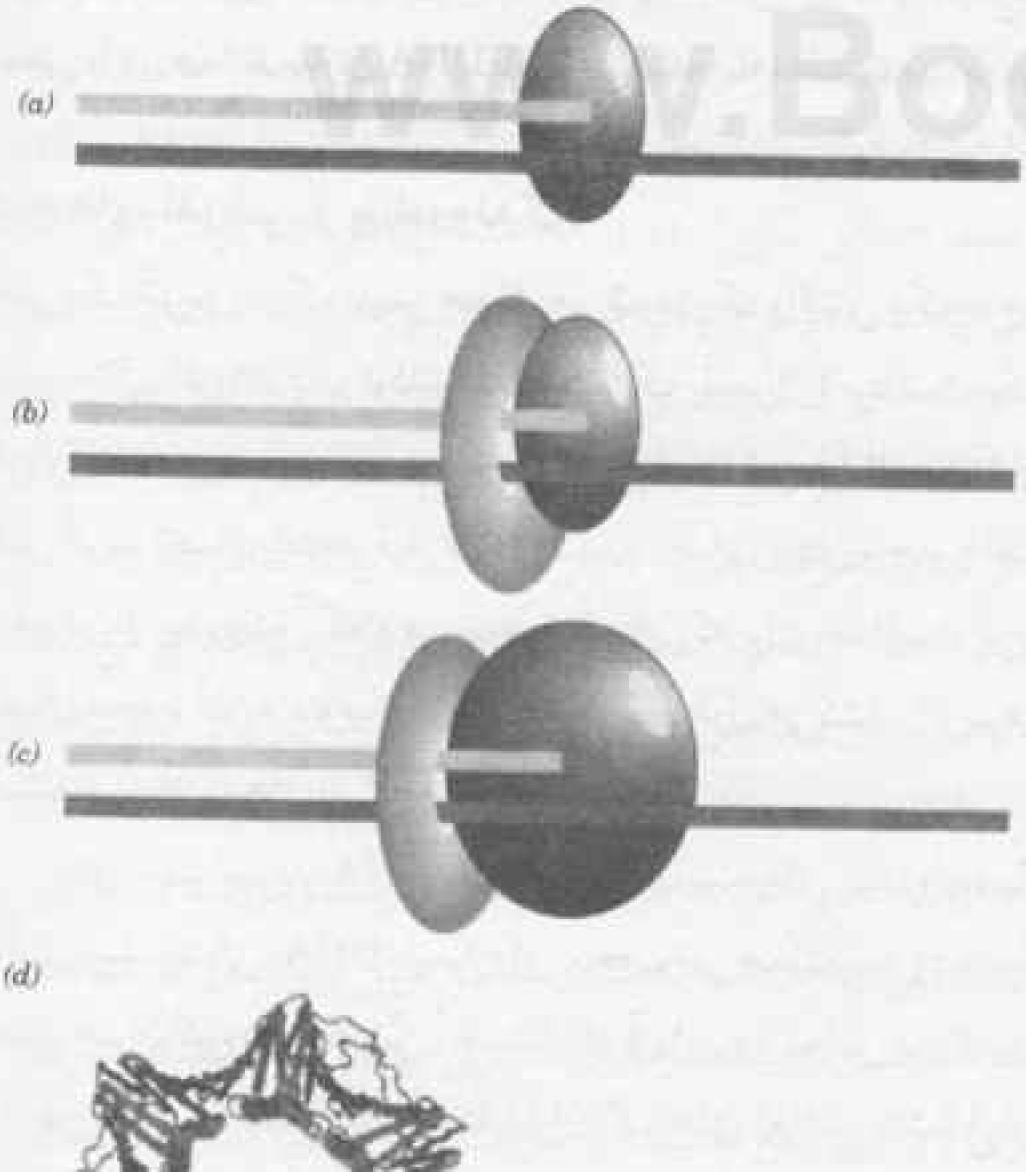
وقتی یک آنزیم به یک پلیمر متصل می‌شود، یک واکنش یک مرحله‌ای را انجام می‌دهد (برای مثال، افزودن یک نوکلئوتید توسط یک پلیمراز یا برداشت یک نوکلئوتید توسط یک اگزونوکلئاز)، و سپس از سوبسترا جدا می‌شود؛ این فرایند را **انتشاری**[1] گویند. برعکس، وقتی آنزیم اتصال‌یافته و قبل از جداشدن، تعداد زیادی واحد را اضافه (یا برداشت) کند، به آن فرایند **پیشرونده**[2] گفته می‌شود. از آنجایی‌که برای جداشدن آنزیم از سوبسترا و سپس اتصال مجدد آن به سوبسترا زمان مشخصی طول می‌کشد، آنزیم‌های انتشاری به مراتب آهسته‌تر از آنزیم‌های پیشرونده عمل می‌کنند.

برای سنتز سریع DNA جدید، وجود پلیمرازهای پیشرونده یک مزیت است. برای افزایش پیشروندگی، DNA پلیمرازهای مخصوص همانندسازی همراه با پروتئین‌های فرعی، تحت عنوان **گیره‌های لغزشی**[3] هستند که آنها را در تماس با زنجیر DNA در حال رشد قرار می‌دهند. در سلول‌های پستانداران، گیره‌های لغزشی متشکل از پروتئینی به‌نام آنتی‌ژن هسته‌ای سلول در حال تکثیر[4] (PCNA) هستند که در آن سه ملکول PCNA حلقه‌ای را در اطراف مارپیچ دورشته DNA به‌وجود می‌آورند (شکل ۱۰-۴). برای همایش این

1. Distributive 2. Processive 3. Sliding clamps 4. Proliferating cell nuclear antigen



شکل ۹-۴ مکانیسم توپوایزومراز. توپوایزومراز I (در اینجا آنزیم برش‌دهنده - دوزنده پستانداران شرح داده می‌شود) یک واکنش ترانس استریفیکاسیون را کاتالیز می‌کند که منجر به ایجاد یک پیوند فسفودی‌استری بین کربن ′۳ یک ریشه موجود بر روی زنجیر DNA و یک ریشه تیروزین موجود بر روی توپوایزومراز (قسمت راست) می‌شود. (توپوایزومرازهای دیگر یک پیوند فسفودی‌استری با کربن ′۵ ایجاد می‌کنند.) این موضوع سبب حفظ پیوستگی اسکلت قند - فسفات و آزادسازی قسمت دیگر زنجیر DNA در جهت چرخش حول (یا عبور از میان) پارتنر خود می‌شود؛ نتیجه تغییر در عدد ارتباطی است. سپس OH - ′۵ باقیمانده در سمت دیگر این انقطاع به پیوند فسفودی‌استری موجود در بین نوکلئوتید و پروتئین حمله کرده و با تولید مجدد اسکلت DNA سبب آزادسازی پروتئین می‌شود (قسمت چپ). توجه داشته باشید که از آنجایی که این فرایند شامل مجموعه‌ای از ترانس‌استریفیکاسیون می‌باشد، نیاز به هیچ کوفاکتور پرانرژی نمی‌باشد.

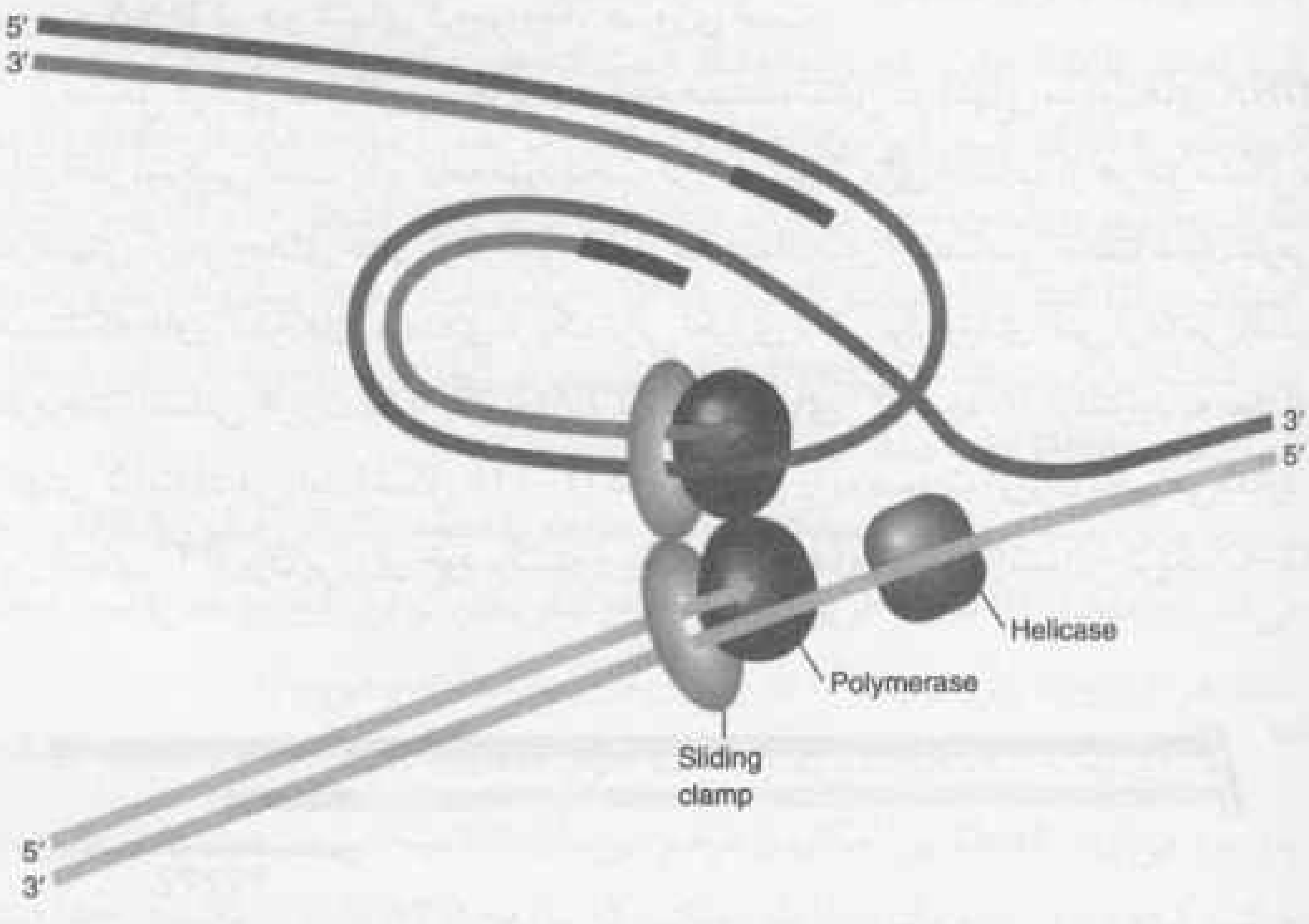


شکل ۱۰-۴ گیره‌های لغزشی. (a) یک پروتئین بارگیر -گیره به DNA اتصال می‌یابد. (b) این بارگیر -گیره سبب همایش یک گیره لغزشی بر روی زیرواحدهای خود می‌شود. (c) DNA پلیمراز به گیره همایش‌یافته متصل شده و پیشرونده می‌شود. (d) ساختمان گیره لغزشی در سلول‌های پستانداران که تریمری از زیرواحدهای PCNA است. DNA به راحتی از میان سوراخ بزرگ موجود در مرکز این کمپلکس عبور می‌کند.

حلقه در اطراف DNA نیاز به آنزیم‌های فرعی تحت عنوان **فاکتورهای بارگیری - گیره**[1] می‌باشد. با اتصال به یک گیره لغزشی، DNA پلیمراز پیشرونده‌تر می‌شود؛ این تغییر سبب افزایش سرعت و صحت سنتز می‌گردد.

رقص‌آرایی در سه بُعد: رپلیزوم

رقص‌آرایی پیچیده‌ای که در بالا به آن اشاره شد، در داخل حجم کاملاً مشخصی از سلول باکتری یا هسته یک سلول اوکاریوتی رخ می‌دهد که همچنین حاوی ملکول‌های متعدد دیگری است که وظایف خود را انجام می‌دهند. ایده وجود دو کمپلکس همانندسازی بزرگ که سریعاً در اطراف DNA در هر چنگال همانندسازی بچرخند، قابل دفاع نیست. بسیار ساده‌تر است که DNA استوانه‌ای بسیار نازک حول محور خود پیچیده و در میان یک کمپلکس همانندسازی بزرگ حرکت کند. پلیمرازهایی که بر روی رشته‌های رهبر و پیرو کار می‌کنند، به صورت یک کمپلکس بزرگ به نام **رپلیزوم**[2] همایش می‌یابند (شکل ۱۱-۴). وقتی DNA از میان رپلیزوم حرکت می‌کند، هر دو رشته سنتز می‌شوند. رشته پیوسته به‌صورت امتدادیافته وارد رپلیزوم شده و از انتهای ۳′ خود امتداد داده می‌شود. رشته ناپیوسته اتصال یافته تا امکان سنتز یک قطعه اوکازاکی فراهم گردد و سپس آزاد می‌گردد تا امکان انجام مراحل پایانی (برداشت پرایمر، پرکردن شکاف و دوختن) فراهم گردد، در حالی که الگو از قسمت جلوتر به رپلیزوم اتصال یافته تا امکان سنتز قطعه اوکازاکی دیگر فراهم شود.



شکل ۱۱-۴ همانندسازی هر دو رشته در یک رپلیزوم. با اتصال دو پلیمراز همانندسازی به یکدیگر و قوس‌نمودن رشته ناپیوسته به‌طوری که بتواند از میان کمپلکس عبور کند، هر دو رشته را می‌توان در یک محل ساخت. DNA از میان این کمپلکس عبور داده شده و در هنگام عبور چرخش داده می‌شود؛ کمپلکس‌های پروتئینی بزرگ حول DNA چرخش نمی‌کنند.

1. Clamp-loading factors 2. Replisome

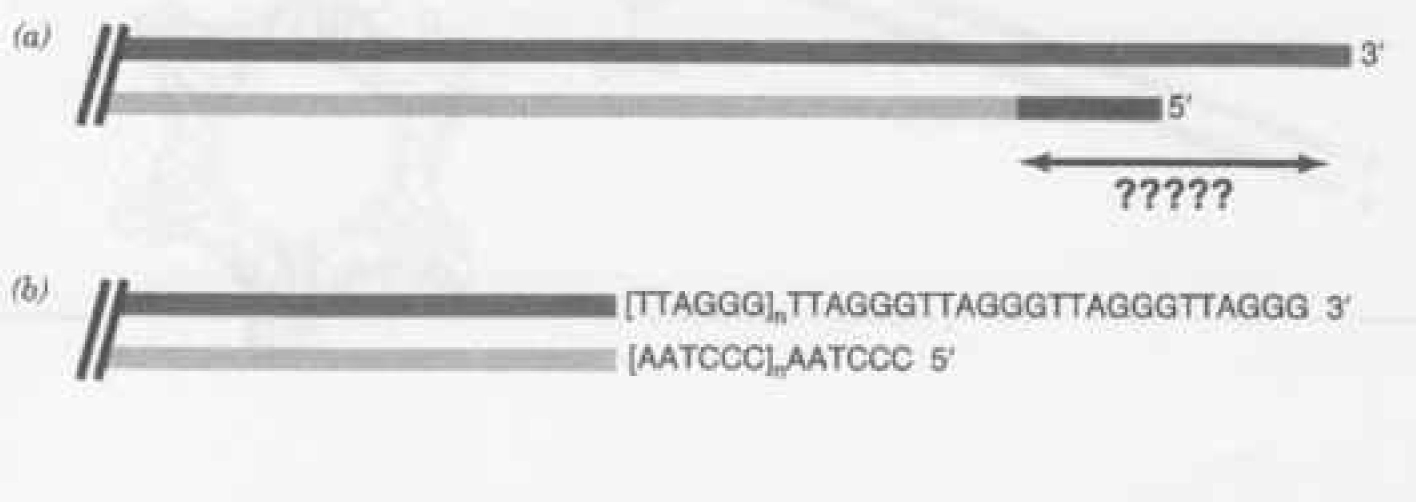
خاتمه همانندسازی در ژنوم‌های حلقوی

خاتمه همانندسازی یک ژنوم حلقوی عموماً °۱۸۰ بعد از مبداء صورت می‌پذیرد. دو چنگال همگرای همانندسازی به یکدیگر رسیده و آخرین قسمت ژنوم سنتز می‌شود. لازم است ارتباط توپولوژیکی دو کروموزوم جدید قطع شود. این عمل یکی از فعالیت‌های کلیدی توپوایزومرازهای نوع II می‌باشد. در برخی ویروس‌های کوچک نظیر **SV40**، خاتمه در محلی رخ می‌دهد که چنگال‌های همانندسازی به یکدیگر می‌رسند؛ هیچ توالی خاصی درگیر نیست. ژنوم *E.coli* حاوی توالی‌های خاتمه اختصاصی است که با جلوگیری از پیشرفت چنگال‌های همانندسازی بعد از این ناحیه، سبب می‌شوند خاتمه در یک ناحیه مشخص رخ دهد.

خاتمه همانندسازی در ژنوم‌های خطی: تلومرها

سلول‌های انسانی و در کل سلول‌های اوکاریوتی، کروموزوم خطی دارند. مشکلات خاصی در خصوص همانندسازی دو انتهای کروموزوم‌های خطی وجود دارد. دقیقاً مشکل همانندسازی دو انتهای کروموزوم‌های خطی چیست؟ با وجود این که رشته پیوسته می‌تواند از نظر تئوری تا انتهای الگوی خود سنتز شود، ولی رشته ناپیوسته نمی‌تواند. محلی برای سنتز پرایمری وجود ندارد که بتوان نوکلئوتیدهای مخالف انتهای الگو را به آن اضافه نمود (شکل *a*۱۲-۴). حتی اگر یک پرایماز می‌تواند از انتهای آخر الگو شروع کند، برداشت این **RNA** منجر به ایجاد یک شکاف می‌شود. با وجود این که ناتوانی در تکمیل رشته پیرو در انتهای کروموزوم در نسل اول می‌تواند مشکلی ایجاد نکند، طی چرخه‌های متمادی همانندسازی، انتهای کروموزومی کوتاه شده تا این که ژن‌های ضروری از دسته رفته و سلول بمیرد. لذا جلوگیری از حذف پیوسته **DNA** در دو انتهای کروموزوم‌ها ضروری است.

مشکل دیگری که اوکاریوت‌ها با آن مواجه هستند، تمایل دو انتهای ملکول‌های **DNA** برای آغاز نوترکیبی است (در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرد). برای اجتناب از هر دو مشکل، دو انتهای کروموزوم‌های خطی اوکاریوتی شامل ساختمان‌های اختصاصی تحت عنوان **تلومر** هستند که حاوی تکرارهای متعددی از یک توالی تکراری شش نوکلئوتیدی غنی از G می‌باشد. تلومرهای انسانی هزاران تکرار **TTAGGG** دارند. انتهای ′۳ حدود ۱۸ نوکلئوتید به بعد از انتهای ′۵ امتداد می‌یابد (شکل *b*۱۲-۴) که سه تکرار را به صورت آویزان باقی می‌گذارد. این انتهای ′۳ آویزان بر روی خود برگشته و پیوندهای هیدروژنی غیرواتسون-کریک G-C



شکل ۱۲-۴ تلومرهای انسانی. (a) مشکل همانندسازی تلومر. انتهای ′۳ یک رشته مادری به‌عنوان الگو برای رشته دختر ناپیوسته (رو به عقب) با رنگ برنزه تیره، رشته دختر با رنگ برنزه روشن، و یک پرایمر RNA به رنگ ارغوانی نشان داده شده است. مشکل این است که محلی برای سنتز پرایمر وجود ندارد تا تکمیل رشته دختر امکانپذیر شود (ناحیه‌ای که با علامت سؤال نشان داده شده است). لذا رشته دختر کوتاه‌تر از رشته مادر خواهد بود. با برداشت آخرین پرایمر RNA این رشته کوتاه‌تر نیز خواهد شد. (b) یک تلومر حاوی توالی‌های تکراری پشت‌سرهم با ۶ نوکلئوتید، TTAGGG، که در آن رشته غنی از G به اندازه حدود ۱۸ - ۱۲ نوکلئوتید به بعد از رشته غنی از C امتداد یافته است.

را به‌وجود می‌آورد و همچنین به پروتئین‌هایی اتصال می‌یابد که طول آن را مشخص نموده و دو انتهای کروموزوم را در برابر نوترکیبی محافظت می‌کنند.

اپی‌ژنتیک

یکی از مهمترین علامت‌گذاری‌های اپی‌ژنتیکی در DNA پستانداران، متیلاسیون ریشه‌های C بر روی هر دو رشته حاوی توالی‌های متعدد CpG می‌باشد. این تغییر می‌تواند سبب تنظیم و خاموش‌سازی برخی ژن‌ها شود (فصل ۸). این الگوهای متیلاسیون می‌توانند به سلول‌های دختر به ارث برسند، ولی به چه شکلی؟ در هنگام همانندسازی، رشته جدید به شکل کم‌متیله سنتز شده و ریشه‌های تغییرنیافته C اضافه می‌گردند. دوباره متیلاسیون با DNA متیل‌ترانسفرازهایی برقرار می‌گردد که DNA نیمه‌متیله حاصل از همانندسازی نیمه‌حفظ‌شده را شناسایی می‌کنند (C موجود بر روی رشته قدیمی متیله بوده و C موجود بر روی رشته جدید متیله نیست) و C جدیدی که اضافه شده است را متیله می‌کنند.

۳-۴ • همانندسازی DNA: آنزیم‌ها و تنظیم

آنزیم‌های پروکاریوتی همانندسازی

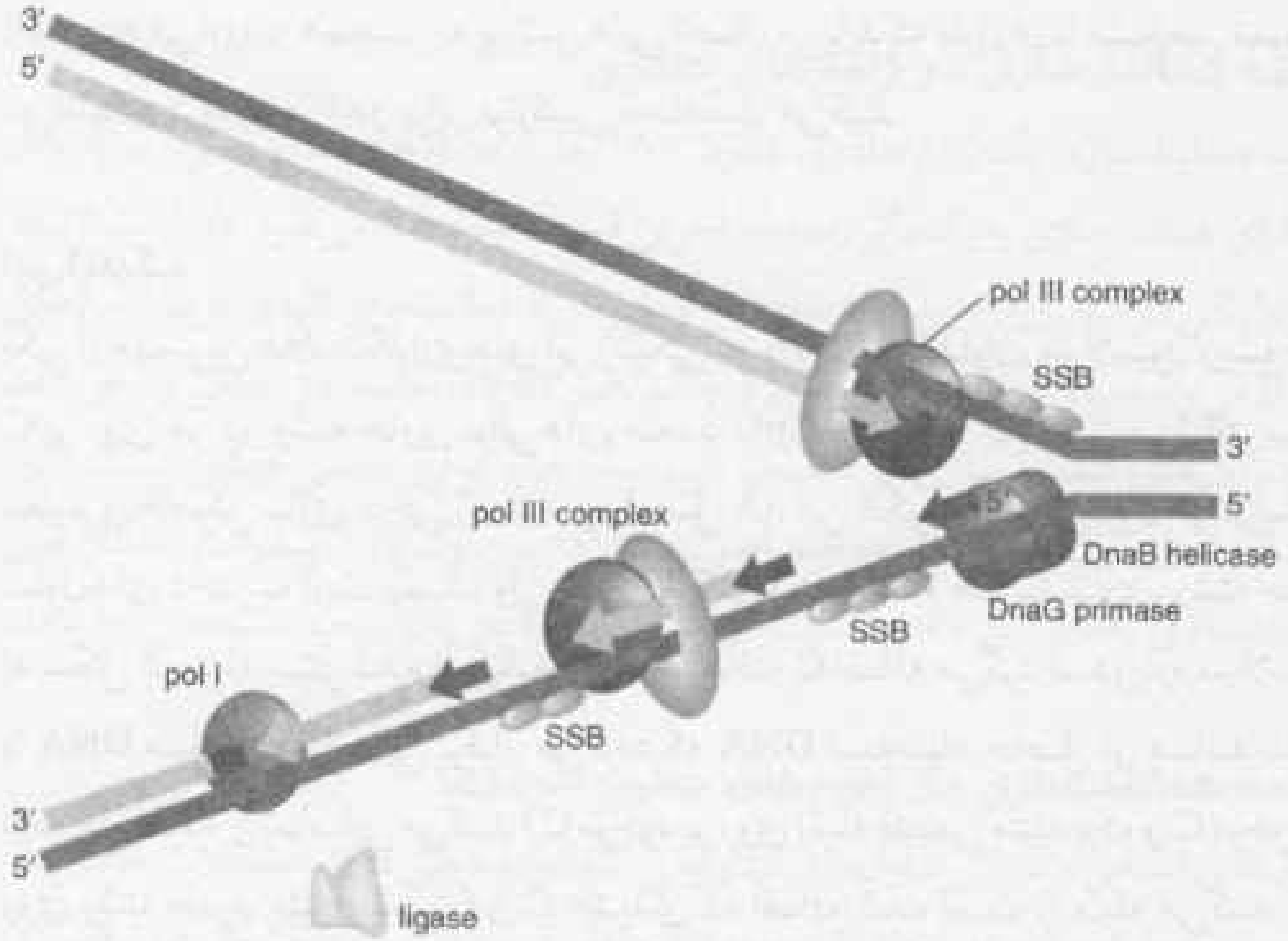
آنزیم‌هایی که سبب حرکت چنگال همانندسازی در *E.coli* می‌شوند، در شکل ۱۳-۴ نشان داده شده‌اند. DNA پلیمراز اصلی موجود در *E.coli*، آنزیم **DNA پلیمراز III (pol III)** می‌باشد. pol III یک کمپلکس چند زیرواحدی است که رشته پیوسته و همچنین بیشتر رشته پیرو را سنتز می‌کند. هسته پلیمرازی حاوی یک زیرواحد θ برای کاتالیز تولید پیوند فسفودی‌استری، یک زیرواحد β برای فعالیت $3'$ به $5'$ اگزونوکلئازی غلط‌گیری و یک زیرواحد β است[1]. گیره لغزشی *E.coli* حاوی دو زیرواحد β است که طی یک مرحله نیازمند ATP توسط کمپلکس γ (بارگیر گیره[2]) بر روی DNA همایش می‌یابد. زیرواحدهای β حلقه‌ای را در اطراف مارپیچ دورشته به‌وجود می‌آورند و در طول آن می‌لغزند (شکل ۱۰-۴)؛ بدین ترتیب کمپلکس pol III را نگه داشته تا سنتز DNA به یک فرایند شدیداً پیشرونده تبدیل شود. این کمپلکس می‌تواند سنتز DNA را تا جداشدن از الگو و یا برخورد با برخی از انواع آسیب‌های DNA ادامه دهد.

بر روی رشته پیرو، این کمپلکس بعد از مواجه با قطعه اوکازاکی قبلی، DNA را آزاد می‌کند. دو ملکول pol III از طریق زیرواحد τ در کنار یکدیگر قرار گرفته و بدین‌ترتیب امکان سنتز هر دو رشته پیرو و رهبر را در یک رپلیزوم بزرگ فراهم می‌سازد.

بر روی رشته پیرو، DNA پرایماز (تحت عنوان DnaG) کمپلکسی را با هلیکاز DnaB به‌وجود می‌آورد. DnaB این امکان را فراهم می‌سازد تا کمپلکس در طول رشته ناپیوسته حرکت کرده و دو رشته مادری را طی حرکتی که نیاز به ATP دارد، از یکدیگر جدا کند.

۱. براساس کتاب‌های مرجع دیگر، این فعالیت‌ها به‌ترتیب مربوط به زیرواحدهای α و ϵ هستند. مترجم

2. Clamp loader



شکل ۱۳-۴ آنزیم‌های همانندسازی در *E.coli*. رشته پیوسته (بالا) توسط Pol III مرتبط با یک گیره لغزشی امتداد داده می‌شود. کمپلکس DNA هلیکاز / پرایماز (DnaB/DnaG) در طول الگو برای رشته ناپیوسته (پایین) حرکت می‌کند، این آنزیم مکث نموده تا به DnaG امکان سنتز یک پرایمر RNA را برای هر ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ نوکلئوتید را بدهد. pol III پرایمر را تا رسیدن به پرایمری ادامه می‌دهد که قطعه اوکازاکی قبلی از آن سنتز شده است. در این زمان، pol III، DNA را آزاد کرده و pol I به انتهای قطعه اوکازاکی اتصال می‌یابد. pol I پرایمر نوکلئوتیدی را با فعالیت ′۵ اگزونوکلئازی یکی یکی برداشت کرده و به‌طور همزمان شکاف موجود را طی فرایندی به‌نام انتقال بریدگی پر می‌کند. وقتی برشی باقیمانده است که در دو طرف آن داکسی‌ریبونوکلئوتیدها وجود دارند، DNA لیگاز می‌تواند این برش را بدوزد.

DNA تک- رشته حاصل از فعالیت هلیکاز توسط **پروتئین اتصالی DNA تک-رشته (SSB)** پوشانده می‌شود که مانع اتصال مجدد رشته‌های مادری شده و از ایجاد ساختمان‌های سنجاقی و سایر ساختمان‌های دوم در DNA تک-رشته جلوگیری می‌کند. کمپلکس هلیکاز / پرایماز تقریباً در هر ۲۰۰۰-۱۰۰۰ bp متوقف شده و پرایماز DnaG یک پرایمر RNA کوتاه را سنتز می‌کند. این پرایمر RNA توسط DNA پلیمراز III و گیره لغزشی همراه آن، به صورت قطعات اوکازاکی با حدود ۲۰۰۰-۱۰۰۰ bp امتداد داده می‌شوند. وقتی این کمپلکس پلیمرازی به RNA پرایمر قطعه اوکازاکی قبلی می‌رسد، متوقف شده و DNA از کمپلکس pol III جدا می‌شود.

در *E.coli*، برداشت پرایمر و پرنمودن شکاف هر دو توسط یک آنزیم، به‌نام **DNA پلیمراز I (pol I)** کاتالیز می‌شود. pol I فعالیت ′۵ به ′۳ اگزونوکلئازی دارد که پرایمر RNA را از انتهای ′۵ قطعه اوکازاکی سنتز شده قبلی برداشت نموده و بدین‌ترتیب همانند RNase H عمل می‌کند. این آنزیم همچنین فعالیت DNA پلیمرازی دارد که داکسی‌ریبونوکلئوتیدها را به انتهای ′۳ قطعه اوکازاکی اضافه می‌کند که اخیراً سنتز شده است؛ بدین ترتیب شکاف حاصل از برداشت پرایمر پر می‌شود (شکل ۱۳-۴). به‌واسطه یک فعالیت ذاتی ′۳ به ′۵ اگزونوکلئازی غلط‌گیری، صحت پرنمودن شکاف افزایش می‌یابد. آنزیم pol I برداشت پرایمر و پرنمودن شکاف را از طریق برداشت یک ریبونوکلئوتید از پرایمر و افزایش طول قطعه اوکازاکی جدیدتر با یک داکسی‌ریبونوکلئوتید، هماهنگ می‌کند. آنزیم این مراحل را آنقدر تکرار می‌کند تا این که پرایمر برداشت شود. آنزیم pol I می‌تواند این فرایند را به قسمت‌های پایین‌تر DNA ادامه داده و بدین‌ترتیب داکسی‌ریبونوکلئوتیدها را با فعالیتی تحت عنوان

انتقال بریدگی[1]، برداشت و جایگزین نماید. این فرایند بیهوده بوده و به‌واسطه این واقعیت محدود می‌شود که pol I به شکل انتشاری عمل نموده و مکرراً از سوبسترا جدا می‌شود. تا زمانی‌که هنوز یک ریبونوکلئوتید باقیمانده است، DNA لیگاز نمی‌تواند بر روی سوبسترا عمل کند، ولی pol I می‌تواند دوباره اتصال یافته و آن ریبونوکلئوتید را جایگزین کند. وقتی شکاف پر شد و تنها یک برش باقی ماند، با جداشدن pol I، آنزیم **DNA لیگاز** فرصت آن را پیدا می‌کند تا با اتصال به این برش، تولید پیوند فسفودی‌استری را کاتالیز نموده و قطعه اوکازاکی را به زنجیر در حال رشد بدوزد.

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، کروموزوم حلقوی *E.coli* تحت **فشار توپولویکی** قرار دارد. با این وجود لازم است برای همانندسازی، مارپیچ دورشته مادری به‌طورکامل بازشده و کروموزوم‌های تکمیل‌شده برای ورود به داخل سلول‌های دختر از یکدیگر جدا گردند. برای همانندسازی نیاز به برداشت ابرفنرهای مثبت می‌باشد، زیرا عدد ارتباطی رشته‌های مادری می‌بایست از یک عدد مثبت بزرگ (حدود ۴۴۰,۰۰۰، زیرا به ازاء هر bp ۱۰/۵ یکبار به دور یکدیگر می‌پیچند) به صفر کاهش یابد تا امکان جداسازی کروموزوم‌های مادری فراهم گردد. لذا **توپوایزومرازها** اهمیت حیاتی برای همانندسازی DNA دارند.

E.coli هر دو نوع توپوایزومرازهای نوع I و نوع II را دارد. توپوایزومراز نوع I در *E.coli* را پروتئین اُمگا (ω) گویند. اُمگا یک جهته عمل کرده و تنها سوپرکویل‌های منفی را برداشت می‌کند. لذا ω برای فراهم‌سازی شرایط همانندسازی کافی نیست. **DNA ژیراز**، به عنوان یک توپوایزومراز نوع II، برای همانندسازی DNA ضروری است. DNA ژیراز به‌عنوان یک «حلقه‌گردان قدرتی[2]» در جهت برداشت ابرفنرهای مثبت یا ایجاد ابرفنرهای منفی عمل می‌کند؛ جهت یکسان است. ژیراز یک هتروتترامر شامل دو زیرواحد «swivelase» که توسط gyrA کد می‌شوند و دو زیرواحد ATPase که توسط gyrB کد می‌شوند، می‌باشد. زیرواحدهای swivelase واکنش‌های ترانس‌استریفیکاسیونی را کاتالیز می‌کنند که اسکلت فسفودی‌استری را شکسته و دوباره به‌وجود می‌آورند که نتیجه آن ایجاد و دوختن مجدد یک برش موقتی بر روی هر دو رشته (یک شکست دو–رشته موقتی) می‌باشد. هیدرولیز ATP که با فعالیت ژیراز جفت می‌شود، برای تولید پیوندهای فسفودی‌استری جدید نیست، بلکه برای آغاز تغییرات کونفورماسیونی است که همگی اجازه عبور مارپیچ دورشته از میان شکست دورشته‌ایی موقتی را فراهم می‌سازند که نتیجه آن کاهش یک جهته عدد ارتباطی است. آنتی‌بیوتیک‌هایی که یکی از زیرواحدهای DNA ژیراز را هدف می‌گیرند، سریعاً همانندسازی *E.coli* را متوقف می‌سازند (ارتباط بالینی ۳–۴). *E.coli* یک فعالیت توپوایزومرازی نوع II دیگر، توپو IV، دارد که برای جداشدن کروموزومی و انتقال آنها به سلول‌های دختر مهم است.

> **ارتباط بالینی ۳–۴**
>
> ## توپوایزومرازها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک[1]
>
> آنتی‌بیوتیک‌هایی که هدف آنها یکی از زیر واحدهای DNA ژیراز است، سریعاً همانندسازی DNA را در *E.coli* متوقف می‌سازند، زیرا از کاهش عدد ارتباطی رشته‌های مادری جلوگیری نموده و مانع بازشدن این رشته‌ها می‌گردند. دو راه برای هدف قرار دادن توپوایزومرازها وجود دارد. مهارکننده‌های توپوایزومراز نظیر کومرمایسین A1[2] و نوویبوسین[3] مانع فعالیت کاتالیتیک می‌شوند؛ هدف آنها ATPase کدشونده توسط gyrB می‌باشد.
>
> سموم توپوایزومراز نظیر اسید نالیدیکسیک اتصالات کووالان DNA–پروتئینی را پایدار می‌کنند؛ در صورت عدم تبدیل به شکست دو– رشته، همانند حالتی که طی همانندسازی رخ می‌دهد، این کمپلکس‌ها کشنده خواهند بود. از اسید نالیدیکسیک برای درمان عفونت ادراری استفاده می‌شود؛ این دارو زیرواحدهای swivelase را هدف می‌گیرد که توسط gyrA کد می‌شوند. سیپروفلو-کساسین[4] که سم توپوایزومراز دیگری است، یکی از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌هایی می‌باشد که امروزه در کلینیک مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ از این آنتی‌بیوتیک در درمان سیاه زخم و بسیاری از عفونت‌های باکتریایی دیگر استفاده می‌شود.
>
> ۱. به‌نظر می‌رسد، تیتر «توپوایزومرازها به‌عنوان اهداف آنتی‌بیوتیک‌ها» صحیح‌تر است مترجم
> 2. Coumermycin A1
> 3. Novoboicin
> 4. Ciprofloxacin

1. Nick translation
2. Power swivel

آنزیم‌های اوکاریوتی همانندسازی

اوکاریوت‌ها نیاز به همان آنزیم‌هایی دارند که در پروکاریوت‌ها وجود دارند، زیرا اساساً همانندسازی از طریق همان مسیر انجام می‌شود. با این وجود از تفاوت‌های موجود در بین آنزیم‌های باکتریایی و انسانی از نظر جزئیات ویژگی و مکانیسم‌های مربوطه، برای درمان ضدباکتریایی با هدف همانندسازی عامل بیماریزا و عدم اثر بر روی سلول‌های میزبان استفاده می‌شود.

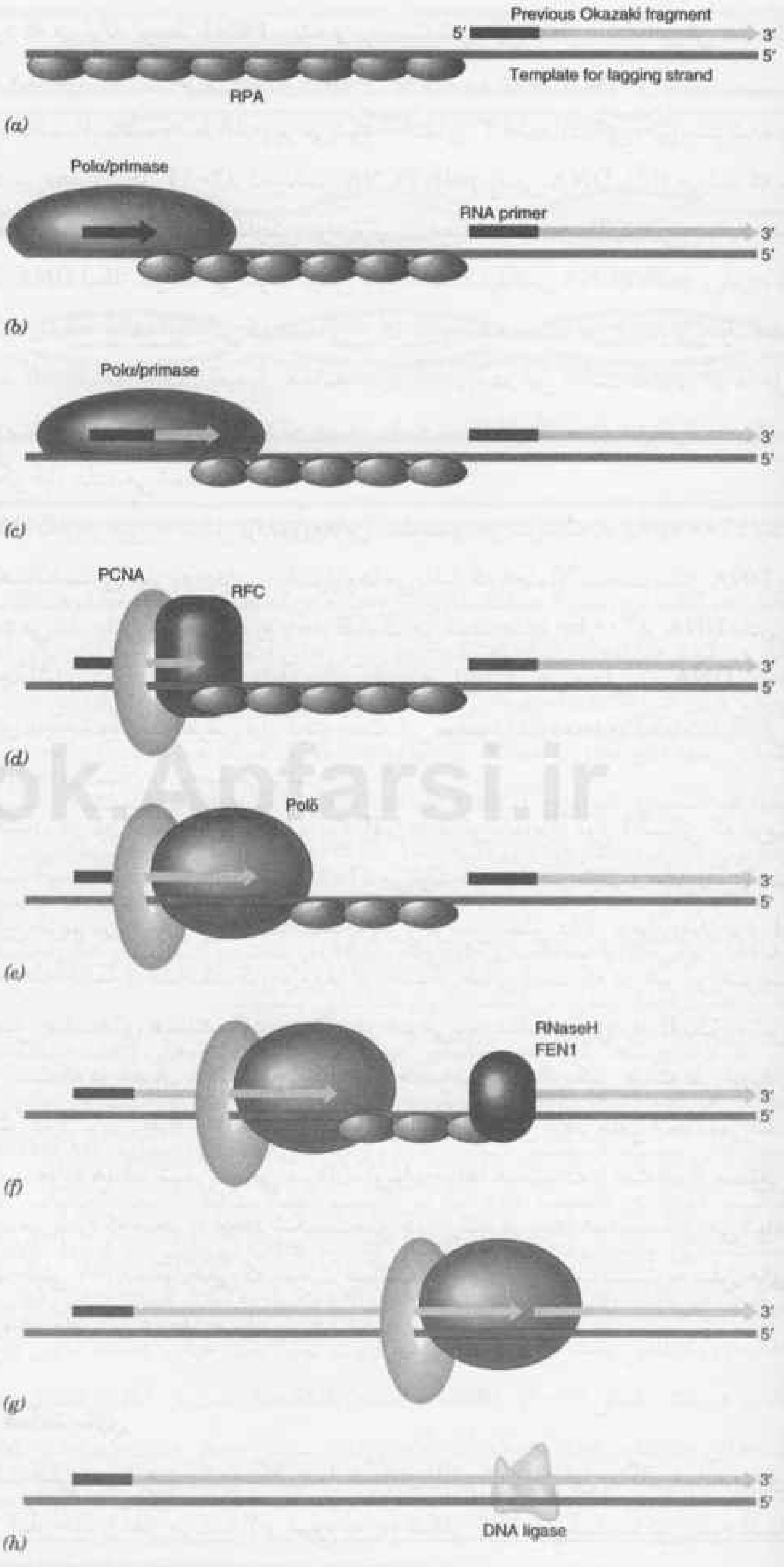
رشته پیوسته موجود در چنگال همانندسازی توسط **DNA پلیمراز δ(polδ)** و به کمک **گیره لغزشی** به‌نام **آنتی‌ژن هسته‌ای سلول در حال تکثیر (PCNA)** سنتز می‌گردد. برای اولین بار PCNA به عنوان یک آنتی‌ژن در هسته سلول‌های در حال همانندسازی یافت شد و بر همین اساس نیز نامگذاری شد. سه زیر واحد PCNA طوری همایش می‌یابند که یک حلقه را در اطراف DNA به‌وجود می‌آورند (شکل ۱۰-۴) و polδ به این حلقه اتصال می‌یابد. برای همایش این حلقه نیاز به **فاکتور بارگیری- گیره** به‌نام فاکتور همانندسازی C[1] (RFC) می‌باشد.

در اوکاریوت‌ها، وضعیت بر روی رشته پیرو قدری پیچیده‌تر از *E.coli* است (شکل ۱۴-۴). با یک فعالیت هلیکازی در اوکاریوت‌ها، رشته‌های مادری جدا شده و یک پروتئین اتصالی DNA تک-رشته به‌نام **پروتئین همانندسازی A**[2] **(RPA)** به تک رشته‌های حاصل اتصال می‌یابد. در اوکاریوت‌ها، پرایماز کمپلکسی را با **DNA پلیمراز α(polα)** ایجاد کرده که سنتز قطعه اوکازاکی را آغاز می‌کند. این کمپلکس **polα/primase** پرایمری را با حدود ۱۰ ریبونوکلئوتید سنتز نموده و سپس از فعالیت پرایمازی به فعالیت DNA پلیمرازی سوییچ نموده و پرایمر را تا ۳۰-۱۵ نوکلئوتید امتداد می‌دهد. وقتی قطعه اوکازاکی به این طول رسید، کمپلکس polα/primase از DNA جدا می‌شود. RFC به این پرایمر امتدادیافته متصل شده و به عنوان یک بارگیر گیره جهت همایش **گیره لغزشی PCNA** عمل می‌کند. سپس polβ[3] به PCNA اتصال یافته و قطعات اوکازاکی را با طول نهایی حدود bp ۲۰۰-۱۳۰ تکمیل می‌کند.

برداشت پرایمر طی دو مرحله توسط RNase H و FEN1 انجام می‌شود. **RNase H** پرایمر RNA را تخریب نموده و یک ریبونوکلئوتید متصل به انتهای قطعه اوکازاکی را باقی می‌گذارد. **آندونوکلئاز آویخته ۱ (FEN1)** آخرین نوکلئوتید (و احتمالاً چند داکسی ریبونوکلئوتید) را برداشت می‌کند؛ برای این منظور، FEN1 یک یا چند نوکلئوتید را از حالت دو رشته خارج کرده تا یک قطعه «آویخته[4]» کوچک به‌وجود آید و سپس پیوند فسفودی‌استری را در محل زاویه می‌شکند تا قطعه آویخته آزادساز شود. در صورتی‌که یک بدتطابق در چند نوکلئوتید ابتدایی قطعه اوکازاکی وجود داشته باشد که به غلط توسط polα اضافه شده است،

---

1. Replication Factor C
2. Replication protein A
۳. براساس ویرایش قبلی کتاب و سایر کتاب‌های مرجع، به‌نظر می‌رسد polδ صحیح است.
4. Flap



شکل ۱۴-۴ آنزیم‌های همانندسازی رشته پیرو در اوکاریوت‌ها (رشته رهبر نشان داده نشده است). (a) RPA، به‌عنوان یک SSB به الگوی تک-رشته‌ای اتصال می‌یابد که توسط چنگال پیشرونده همانندسازی باز شده است. یک قطعه اوکازاکی قبلی در سمت راست نشان داده شده است که در آن پرایمر RNA ارغوانی است. (b) فعالیت پرایمازی کمپلکس polα/primase سنتز یک پرایمر RNA را آغاز می‌کند. (c) بعد از این که طول پرایمر RNA به ۱۰ نوکلئوتید رسید، فعالیت پلیمرازی کمپلکس polα/primase تغییر کرده و این پرایمر را با افزودن حدود ۱۵ تا ۳۰ داکسی ریبونوکلئوتید امتداد می‌دهد. سپس polα/primase جدا می‌شود. (d) RFC به این قطعه اوکازاکی که تا حدودی سنتز شده است، اتصال یافته و همایش یک گیره لغزشی از سه ملکول PCNA را کاتالیز می‌کند. (e) polδ به گیره لغزشی اتصال یافته و قطعه اوکازاکی را امتداد می‌دهد. (f) وقتی کمپلکس همانندسازی به پرایمر RNA قبلی می‌رسد، این پرایمر با عمل ترکیبی RNase H و FEN-1 تخریب می‌گردد. (g) شکاف با تداوم طویل‌سازی قطعه اوکازاکی پر می‌شود. (h) برش باقیمانده توسط DNA لیگاز دوخته می‌شود.

است، این بدتطابق سبب ناپایداری انتهای ′5 شده و قطعه آویخته بزرگتری را به‌وجود می‌آورد که می‌تواند توسط FEN1 بریده و برداشت شود. این عمل سبب افزایش صحت فرایند همانندسازی از طریق حذف خطاهای ایجادشده توسط polα می‌گردد.

شکاف باقیمانده توسط polδ پر می‌شود که انتهای ′3 قطعه اوکازاکی اخیراً سنتز شده را امتداد می‌دهد (شکل ۱۴-۴). کمپلکس polδ/PCNA زمانی DNA را آزاد می‌کند که با dNTPs در انتهای ′5 قطعه اوکازاکی مواجه شود که قبلاً سنتز شده است. برش باقیمانده توسط DNA لیگاز دوخته می‌شود. سپس لازم است کمپلکس polδ/PCNA رپلیزوم با اتصال دوباره به قطعه اوکازاکی که قسمتی از آن سنتز شده است، این فرایند را تکرار کند. همانند *E.coli*، دو ملکول پلیمراز همانندسازی اصلی، در این حالت polδ، در داخل رپلیزوم یا «کارخانه همانندسازی» که هر دو رشته در داخل آن سنتز می‌شوند، در کنار یکدیگر قرار داده می‌شوند.

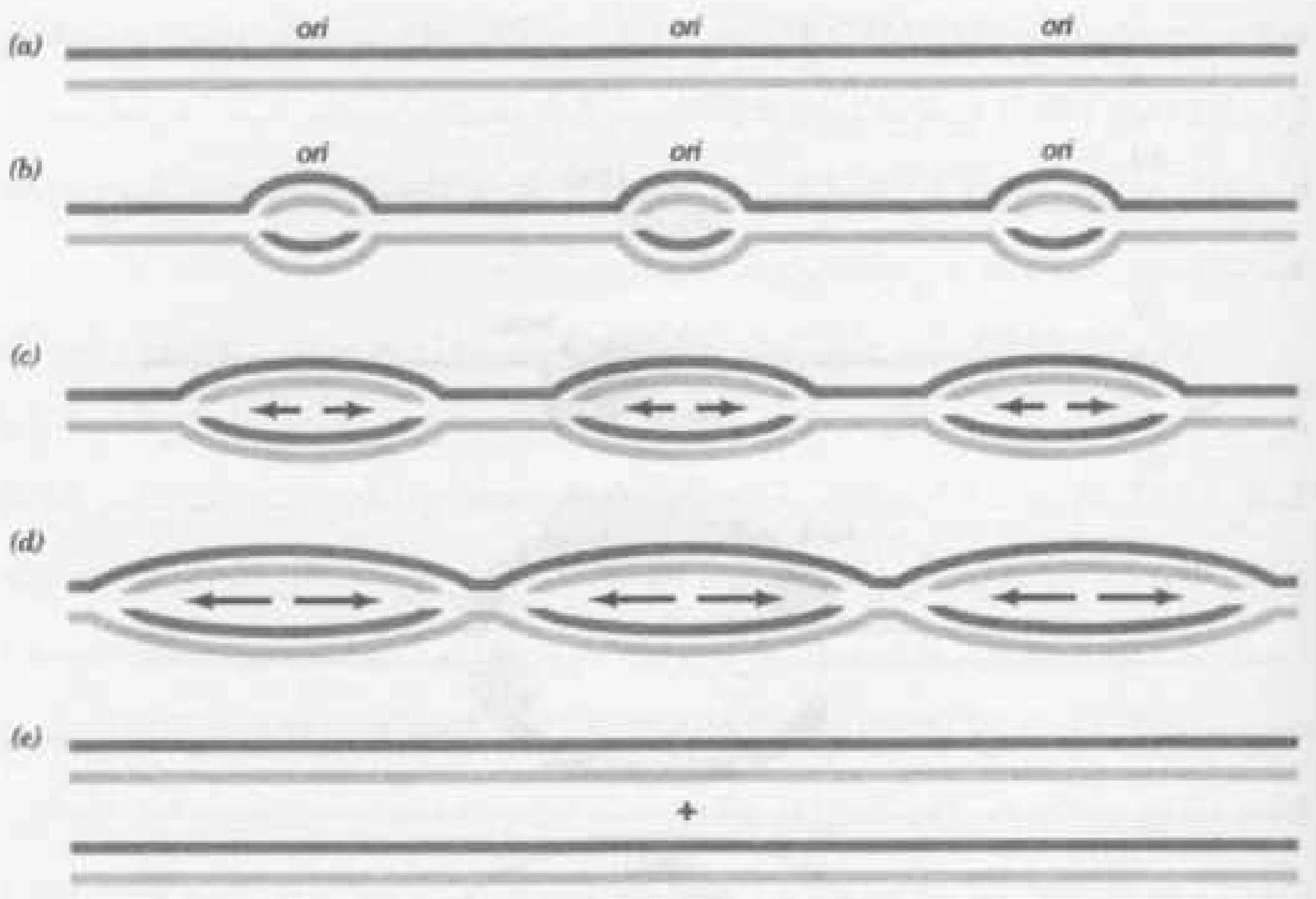
DNA اوکاریوتی به شکل **نوکلئوزوم‌هایی** بسته‌بندی می‌شوند که تقریباً ۲۰۰ bp دارند. برای همانندسازی نیاز به جدایی نوکلئوزوم‌ها می‌باشد که احتمالاً سرعت سنتز DNA را محدود می‌کند. وقتی یک نوکلئوزوم واحد تفکیک می‌شود، حدود ۲۰۰ bp از DNA مادری برای جداشدن در دسترس قرار دارد؛ سنتز پرایمر می‌تواند در هر محلی در DNA تک-رشته‌ای انجام شود که درمعرض قرار گرفته است. این موضوع اندازه محدود قطعات اوکازاکی در سلول‌های انسان را توجیه می‌کند.

انسان هر دو توپوایزومراز نوع I و نوع II را دارد. توپوایزومراز نوع I انسانی که آنزیم شکست-بست[1] نامیده می‌شود (شکل ۹-۴)، می‌تواند هر دو ابرفنر مثبت و منفی را برداشت کند؛ این آنزیم در هر دو فرایند همانندسازی و رونویسی نقش دارد. توپوایزومراز نوع II برای مرحله خاتمه و جداشدن کروموزوم‌ها از یکدیگر حیاتی است که در غیر این صورت با تکمیل حباب‌های همانندسازی متعدد، در هم می‌پیچیدند. توپوایزومراز II یک پروتئین فراوان است که در اتصال DNA به جایگاه‌های اختصاصی در ماتریکس هسته طی اینترفاز نیز نقش دارد. توپوایزومراز نوع II انسانی یک ژیراز نیست، یعنی ابرفنر منفی ایجاد نمی‌کند. در اغلب موارد هدف شیمی‌درمانی سرطان، توپوایزومرازها هستند که با استفاده از سمومی صورت می‌پذیرد که منجر به ایجاد شکست‌های دو-رشته در زمان همانندسازی می‌شوند (ارتباط بالینی ۷-۲). سلول‌هایی که سرعت همانندسازی بالاتری دارند، نسبت به سلول‌های ساکن، در برابر این داروها حساس‌تر هستند.

شروع همانندسازی

در بحث قبلی به پیشرفت یک چنگال همانندسازی اشاره شد. ولی این چنگال همانندسازی چطور کار خود را آغاز می‌کند؟ و شروع به چه شکلی کنترل می‌شود تا کل ژنوم تنها

1. Nicking-closing enzyme

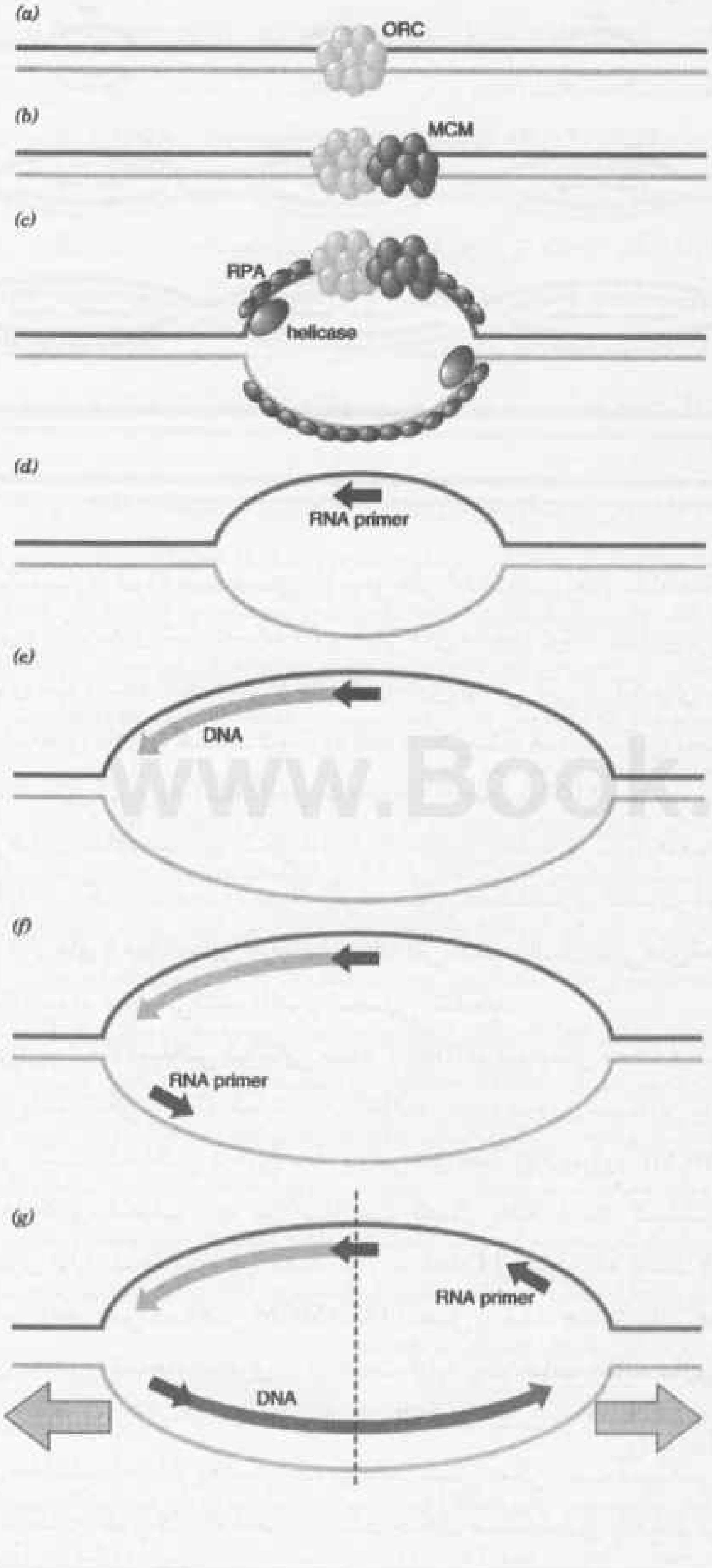


شکل ۱۵-۴ رپلیکون‌های پشت سرهم و همانندسازی دوطرفه در اوکاریوت‌ها. (a) در هر کروموزوم اوکاریوتی، مبداءهای متعدد همانندسازی (ori) به‌صورت پشت سرهم وجود دارند. در انسان اینها به فواصل تقریباً ۵۰,۰۰۰ تا ۱۰۰,۰۰۰ جفت باز وجود دارند. (b) شروع در هر مبداء رخ می‌هد. دستجات مجاور این مبداءها تمایل دارند تا با یکدیگر کار کنند. (c) دو چنگال همانندسازی در هر مبداء تشکیل شده که از یکدیگر دور می‌شوند، لذا همانندسازی دوجهته است. ساختمان‌های حاصل را حباب‌های همانندسازی می‌نامند. (d) با ادامه همانندسازی، حباب‌ها بزرگتر می‌شوند تا این که کاملاً به یکدیگر نزدیک شوند. در این مرحله، با خاتمه همانندسازی، حباب‌های مجاور به یکدیگر پیوسته و DNA مادری جدا می‌شوند. توپوایزومراز II برای خاتمه همانندسازی و جدایی کروموزوم‌ها ضروری است. (e) سپس کروموزوم‌های دوبرابر شده حاصل می‌توانند جدا شده و وارد دو سلول دختر شوند.

یکبار همانندسازی شود؟ همانندسازی از محل‌های اختصاصی به‌نام **مبداء همانندسازی** آغاز می‌گردد. مبداءهای شناخته‌شده حاوی توالی‌های متعدد، کوتاه و تکراری برای اتصال پروتئین‌های شروع‌کننده اختصاصی و همچنین حاوی نواحی غنی از AT برای جداشدن ابتدایی رشته‌های مادری، هستند. کروموزوم *E.coli* یک مبداء همانندسازی، تحت عنوان مبداء همانندسازی کروموزوم[1] (oriC)، دارد که ناحیه‌ای با حدود 245 bp است. در سلول‌های اوکاریوتی هزاران مبداء وجود دارد (شکل ۱۵-۴) که اجازه می‌دهد تا این سلول‌ها میزان زیادی از DNA را طی یک زمان محدود در هر چرخه سلولی همانندسازی کنند. در مخمر این مبداءها را **توالی‌های با همانندسازی خودمختار**[2] (ARS) می‌نامند. در انسان، توالی‌های اختصاصی که به عنوان مبداء عمل می‌کنند، تاکنون شناسایی نشده‌اند.

در اوکاریوت‌ها، **کمپلکس شناسایی مبداء**[3] (ORC) در مبداءهای متعدد همانندسازی همایش می‌یابند (شکل ۱۶-۴). همایش یک ORC در مبداء ضروری است، ولی برای رخداد شروع کافی نیست. کمپلکس دیگری به‌نام **پروتئین‌های حفظ ریزکروموزوم**[4] (MCM) که یک فعالیت هلیکازی ضعیف دارد نیز می‌بایست اتصال یافته تا یک کمپلکس قبل-همانندسازی تولید شود؛ برای این اتصال نیاز به Cdc6 (پروتئینی که توسط *Cdc6* کد می‌شود) می‌باشد. وقتی کمپلکس ORC/MCM متصل به مبداء همانندسازی فعال شد، جداسازی ابتدایی رشته‌های مادری را در جهت تولید یک **حباب همانندسازی** کوچک کاتالیز می‌کند (شکل ۱۶-۴). SSBs (در انسان SSB عبارتست از RPA) اتصال یافته و رشته‌های جداشده را جدا از یکدیگر نگه می‌دارد. سپس ممکن است کمپلکس MCM به‌عنوان هلیکازی عمل کند که امکان بازشدن چنگال همانندسازی را فراهم می‌سازد.

1. Origin of chromosomal replication
2. Autonomously replicating sequences
3. Origin recognition complex
4. Minichromosome maintanance proteins



شکل ۱۶-۴ شروع همانندسازی در مبداء همانندسازی اوکاریوتی. (a) کمپلکس شناسایی مبداء (ORC) به یک مبداء اتصال می‌یابد. (b) یک کمپلکس MCM متصل می‌شود؛ در این همایش، پروتئین چرخه تقسیم سلولی ۶ (cdc6) مهم است. (c) کمپلکس شروع‌کننده فعال شده و فعالیت هلیکازی رشته‌های مادری را باز می‌کند تا یک حباب بسیار کوچک تشکیل شود. SSB به تک رشته‌های در معرض قرار گرفته متصل شده، هلیکازها بر روی DNA سوار می‌شوند، و حباب بزرگ‌تر می‌شود. (d) polα/primase ابتدا پرایمر RNA را سنتز می‌کند و بعد از حدود ۱۰ نوکلئوتید، به امتداد آن با داکسی‌ریبونوکلئوتیدها تغییر وضعیت می‌دهد. (در این و پانل‌های بعدی، تمرکز بر روی فرایندهایی است که بر روی DNA رخ می‌دهند و پروتئین‌ها نشان داده نشده‌اند.) (e) بعد از افـزودن ۱۵ تـا ۳۰ داکسی‌ریبونـوکلئـوتید، polα/primase جدا شده و زنجیر توسط DNA پلیمراز δ امتداد داده می‌شود که داکسی‌ریبونوکلئوتیدها را در محل قرار می‌دهد. تا این مرحله، فرایند همانند حالتی است که بر روی رشته ناپیوسته (رو به عقب) رخ می‌دهد (با شکل ۱۴-۴ مقایسه کنید). هرچند، رشته در حال امتداد با قطعه اوکازاکی قبلی مواجه نمی‌شود، می‌تواند طویل‌سازی را ادامه داده و به رشته پیوسته (رهبر) موجود بر روی چنگال همانندسازی با حرکت به چپ تبدیل شود. (f) یک پرایمر RNA بر روی سمت ناپیوسته این چنگال همانندسازی، همانند پیشرفت چنگال طبیعی، سنتز می‌گردد. (g) این پرایمر همانند حالتی که قبلاً اشاره شد، امتداد داده می‌شود. هر چند، این رشته در حال طویل‌سازی با یک قطعه اوکازاکی قبلی مواجه نخواهد شد و می‌تواند طویل‌سازی را ادامه دهد تا به یک رشته پیوسته (رهبر) بر روی چنگال همانندسازی دارای حرکت به راست تبدیل شود. با مکانیسم طبیعی، یک پرایمر RNA می‌تواند بر روی این چنگال سنتز شود (با شکل ۱۴-۴ مقایسه کنید). نتیجه دو چنگال همانندسازی است که از مبداء دور می‌شوند. فرایند حول محوری که با خط غیرممتد نشان داده شده است، تقارن دارد که در آن چنگال‌ها که تصویر آینه‌ای یکدیگر هستند از مبداء دور می‌شوند.

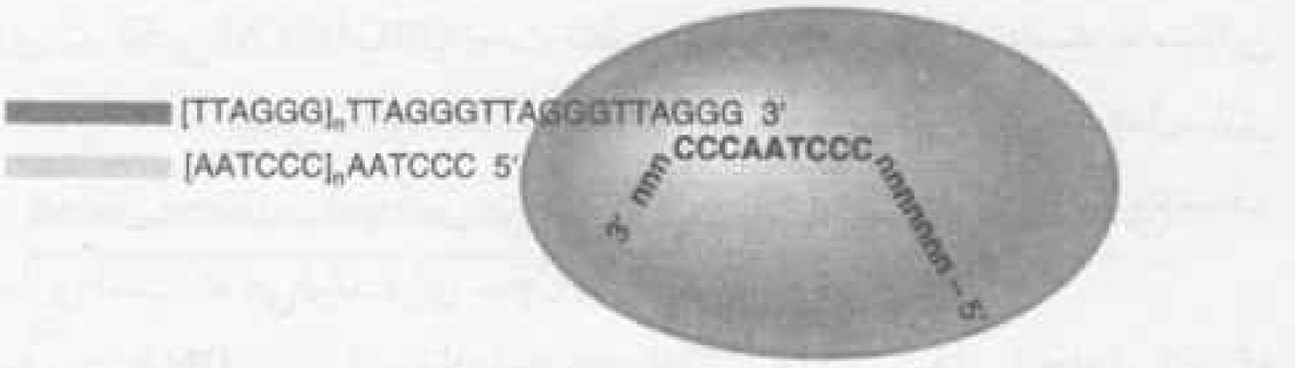
فعال‌سازی کمپلکس ORC/MCM تحت تنظیم **سیکلین‌ها و کینازهای وابسته به سیکلین** قرار دارند (ص ۱۳۳۲). فسفریلاسیون Cdc6 توسط **کیناز وابسته به سیکلین** سبب غیرفعال‌سازی آن و مهار همایش مجدد این کمپلکس می‌شود؛ این یکی از راه‌های جلوگیری از شروع مجدد همانندسازی است که می‌تواند برای سلول ویران‌کننده باشد.

شروع سنتز DNA بیشتر با استفاده از همان مکانیسم‌ها و آنزیم‌هایی انجام می‌شود که در هنگام حرکت یک چنگال همانندسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (شکل ۱۴-۴ را با شکل ۱۶-۴ مقایسه کنید). در اوکاریوت‌ها، کمپلکس pol α/primase سنتز یک پرایمر RNA را آغاز نموده و سپس به طویل‌سازی آن با dNTPs سوییچ می‌کند. این پلی‌نوکلئوتید کوتاه توسط یک DNA پلیمراز δ به همان طریق رشته ناپیوسته (رو به عقب) در چنگال همانند-سازی، امتداد داده می‌شود. رپلیزومی که این اولین رشته را امتداد می‌دهد، می‌تواند سنتز را ادامه داده و رشته رهبر چنگال را در یک سمت حباب همانندسازی تولید کند (شکل-۱۶-۴). در آن نیمه حباب، سنتز اولین قطعه اوکازاکی بر روی رشته روبه عقب توسط همان مکانیسم مورد استفاده برای حرکت چنگال همانندسازی، آغاز می‌گردد (با شکل ۱۳-۴ مقایسه کنید). هر چند با افزایش طول این اولین قطعه اوکازاکی، حرکت به سمت قطعه قبلی صورت نگرفته و رشد در جهت ′۵ به ′۳ ادامه می‌یابد؛ این قطعه عبور از مبداء، به رشته رهبر چنگال همانندسازی تبدیل می‌شود که در جهت مخالف حرکت می‌کند (شکل ۱۶-۴). هر دو رشته رهبر به امتداد طول به شکل شدیداً پیشرونده ادامه می‌دهند و قطعات اوکازاکی در سمت مخالف سنتز می‌شوند. نتیجه یک جفت چنگال همانندسازی است که از مبداء دور می‌شوند.

تلومرازها

تلومرها که ساختمان‌های تخصص‌یافته‌ای در انتهای کروموزوم‌های خطی در اوکاریوت‌ها هستند (شکل ۱۲-۴)، توسط **تلومرازها** حفظ می‌شوند که آنزیم‌هایی برای اتصال توالی‌های تکراری شش نوکلئوتیدی به انتهای ′۳ تلومرها هستند. تلومرازها کمپلکس‌های ریبونوکلئو-پروتئینی حاوی یک RNA کوچک هستند که به عنوان الگویی برای افزودن توالی تکراری شش نوکلئوتیدی جدید مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۱۷-۴). یک تلومراز به انتهای رشته ′۳ اتصال یافته و قسمتی از RNA تلومراز با چند نوکلئوتید آخر کروموزوم ایجاد پیوند هیدروژنی می‌کند. با استفاده از این RNA به عنوان الگو، یک توالی تکراری شش نوکلئوتیدی سنتز می‌شود. سپس تلومراز می‌تواند جدا شده و دوباره اتصال یابد تا هگزامر دیگری را اضافه کند.

تلومرها دقیقاً طول مورد نظر را حفظ نمی‌کنند؛ تا حدودی کوتاه‌شدن مشکلی را به‌وجود نمی‌آورد، زیرا این توالی‌های تکراری پروتئینی را کد نمی‌کنند. به دلیل ناتوانی در سنتز کامل و افزایش طول با افزودن توالی‌های تکراری شش نوکلئوتیدی جدید به انتهای ′۳ توسط تلومراز (شکل ۱۷-۴)، رشته‌های پیرو تلومرها به‌صورت دوره‌ای کوتاه می‌شوند (شکل-



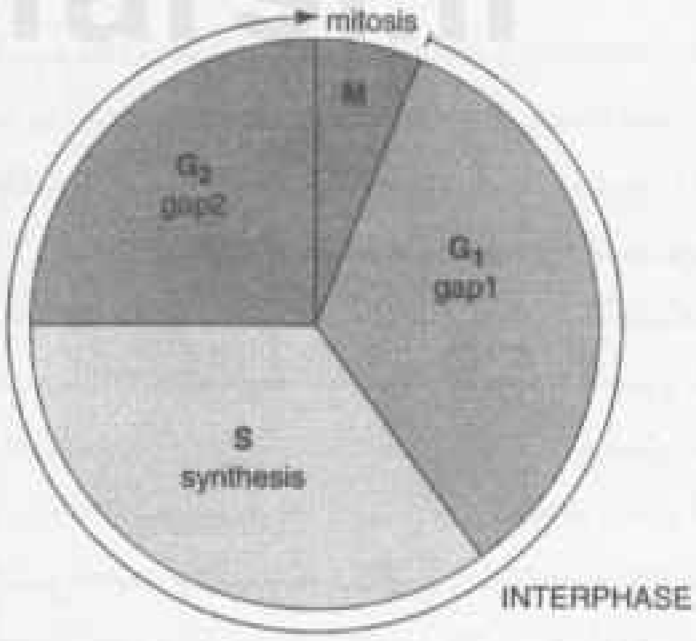
شکل ۱۷-۴ تلومراز. تلومراز یک کمپلکس ریبونو-کلئوپروتئینی با یک رشته RNA کوتاه به‌عنوان یک جزء درونی است؛ این آنزیم افزودن توالی‌های تکراری ۶ نوکلئوتیدی جدید به انتهای ۳′ یک زنجیر DNA را کاتالیز می‌کند. RNA تلومراز به‌طور نسبی با توالی تکراری تلومری ایجاد جفت باز نموده و به عنوان الگویی برای این واکنش عمل می‌کند، در حالی که جزء پروتئینی به عنوان یک ترانس‌کریپتاز معکوس عمل کرده و DNA را با استفاده از این الگوی RNA سنتز می‌کند. بعد از افزودن یک تکرار شش-نوکلئوتیدی، این آنزیم می‌تواند جدا شده و با اتصال مجدد، توالی‌های تکراری ۶ نوکلئوتیدی جدید را اضافه نماید.

a۱۲-۴). با وجود این که طول تلومر ثابت باقی نمی‌ماند، با افزودن توالی‌های تکراری، از کوتاه‌شدن پیشرونده جلوگیری می‌شود. تلومرازها همچنین دوباره آویختگی ۳′ را به‌وجود می‌آورند که مشخصه تلومرها است.

سلول‌هایی که تمایز یافته‌اند و تنها به دفعات محدودی تقسیم می‌شوند، تلومراز را بیان نمی‌کنند. لذا، تلومرها با هر تقسیم کوتاه می‌شوند؛ این موضوع سبب محدودیت تعداد دفعاتی می‌شود که سلول قبل از آغاز آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده به دلیل حذف تلومرها، می‌تواند تقسیم شود (ص ۱۳۴۰). بیان تلومراز عموماً در سلول‌های توموری دوباره فعال شده و به آنها اجازه تداوم تقسیم نامحدود را بدون کوتاه‌شدن کروموزوم را می‌دهد؛ این موضوع تلومراز را به هدف جذابی برای شیمی‌درمانی سرطان تبدیل کرده است. لازم به ذکر است که تلومراز غیرفعال‌شده در یک تومور منجر به توقف سریع رشد تومور نمی‌شود؛ این اثر بعد از چندین دور چرخه سلولی حاصل می‌شود که طی آنها دو انتهای کروموزوم به میزان قابل توجهی کوتاه می‌گردد. لذا مهارکننده‌های تلومراز احتمالاً همراه با سایر درمان‌ها مفید هستند.

چرخه سلولی

در سلول‌های اوکاریوتی، الگوی متفاوت و تنظیم‌شده‌ای از فعالیت‌ها وجود دارد که **چرخه سلولی** را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۸-۴). میتوز برجسته‌ترین خصوصیت فیزیولوژیکی چرخه سلولی است که شامل متراکم‌شدن، به‌صف درآمدن و جداشدن کروموزوم‌ها و به دنبال آن تقسیم یک سلول به دو سلول، می‌باشد. فازی از چرخه سلولی که در آن میتوز رخ می‌دهد را **فاز M** (برای فاز میتوتیک) گویند. همانندسازی **DNA** طی **فاز S** (برای فاز سنتز) انجام می‌شود. فاز **G1** (فاز شکاف[1]) بین میتوز و فاز S، و فاز **G2** (فاز شکاف ۲) بین فاز S و میتوز وجود دارد. مجموع فازهای **G1**، **S** و **G2** را اینترفاز سلول گویند و بیشتر زمان کل یک چرخه سلولی را شامل می‌شود. یکی از نشانه‌های بافت‌شناسی سرطان این است که کسر بیشتری از سلول‌ها نسبت به حالت طبیعی سلول‌ها در حالت میتوز قرار دارند (ارتباط بالینی ۴-۴).



شکل ۱۸-۴ چرخه سلولی. در سلول‌های اوکاریوتی، همانندسازی DNA (فاز S) و میتوز (فاز M) توسط دو شکاف G1 و G2 از یکدیگر جدا می‌شوند. اندازه هر قسمت اشاره به کسر زمانی معمول از چرخه تقسیم سلولی در آن قسمت دارد.

در اوکاریوت‌ها، همانندسازی با تعیین شروع همانندسازی **DNA** تنظیم می‌شود. وقتی همانندسازی شروع شد، سلول‌ها عموماً کل فرایند همانندسازی را سپری می‌کنند. شروع همانندسازی در مبداءهای متعدد می‌بایست هماهنگ شود تا در هر چرخه سلولی، همانندسازی

1. Gap

تمامی نواحی DNA تضمین گردد و هیچ ناحیه‌ای بیش از یکبار همانندسازی نشود. واضح است که این هماهنگی برای سلولی که هزاران مبداء همانندسازی دارد، چالش بزرگی است. ناتوانی در همانندسازی کل ژنوم منجر به ناپایداری کروموزومی و از دست‌رفتن اطلاعات ژنتیکی می‌شود. در صورتی که قسمتی از DNA کروموزومی همانندسازی نشود، دو کروموزوم اولاد حاصل نمی‌توانند به شکل مناسبی از یکدیگر جدا شوند و یا طی این تلاش ممکن است کروموزوم بشکند. کروموزوم‌های شکسته‌شده ناپایدار بوده و نوترکیبی را آغاز می‌کنند که مشکلات بیشتری را به‌وجود می‌آورد. کمبود ژن‌های کلیدی در سلولی که کروموزومی را به‌دلیل بدجداشدن[1] از دست داده است و یا بیان زیادی سایر ژن‌ها در سلولی که نسخه اضافی از یک کروموزوم را دارد، می‌تواند فاجعه‌آمیز باشد. تریزومی ۲۱ که نشانه وجود یک نسخه اضافی از کوچکترین کروموزوم انسانی است، سبب سندروم داون می‌شود و اکثر تری‌زومی‌های دیگر کشنده هستند.

طی فاز S چرخه سلولی، نواحی مختلف ژنوم در زمان‌های متفاوت همانندسازی می‌شوند. به‌طور شاخص نواحی که به‌طور فعال رونویسی می‌شوند، طی مراحل ابتدایی فاز S همانندسازی می‌گردند. برعکس، نواحی هتروکروماتین (که در آن کروماتین متراکم است و به‌طور فعال رونویسی نمی‌شود) معمولاً در اواخر فاز S همانندسازی می‌گردند.

با وجود این که جزئیات این فرایند هنوز به‌خوبی مشخص نیست، به چند اصل عمومی می‌توان اشاره کرد. به مدل رایج، کسب مجوز[2] گفته می‌شود. یک فاکتور مجوزدهنده[3] می‌بایست مبداءها را پیدا نموده و به آنها اجازه شروع همانندسازی را بدهد. این عمل قبل از شروع فاز S رخ می‌دهد و مستلزم اتصال کمپلکس MCM به ORC در مبداءهای متعدد است. این اتصال توسط پروتئین‌های «تطابق‌دهنده[4]» تسهیل می‌گردد که شامل پروتئین چرخه تقسیم سلولی ۶[5] (Cdc6) و فاکتور ۱ مجوزدهنده کروماتینی و همانندسازی DNA[6] (Cdt1) می‌باشد. همایش این کمپلکس قبل - همانندسازی تنها طی فاز G1، قبل از انجام سنتز DNA، رخ می‌دهد. وقتی شروع همانندسازی رخ داد، فاکتور مجوزدهنده با فسفریلاسیون و جداشدن Cdc6 و کمپلکس MCM، غیرفعال می‌گردد. کیناز وابسته به سیکلین[7] (CDK) و کیناز وابسته به Dbf4[8] (DDK) در شروع همانندسازی نقش دارند که فراخوانی رپلیزوم به مبداء، فعال‌سازی فعالیت هلیکازی که رشته‌های مادری را باز می‌کند، و غیرفعال‌سازی فاکتورهای مجوزدهنده، را کاتالیز می‌کنند. برای این که آن مبداء دوباره مورد استفاده قرار گیرد، نیاز به اتصال یک فاکتور مجوزدهنده جدید می‌باشد، ولی همایش کمپلکس نمی‌تواند تا فاز G1 بعدی و در زمانی که پروتئین جدید Cdc6 در دسترس قرار دارد، رخ دهد. پروتئین ژمینین[9] مانع دیگری در برابر همانندسازی مجدد است که به Cdt1 اتصال یافته و آن را مهار می‌کند. این حرکت مانع شروع مجدد نارس طی یک چرخه سلولی واحد می‌شود.

> **ارتباط بالینی ۴-۴**
>
> ### سرطان و چرخه سلولی
>
> سرطان به صورت تقسیم بیش از حد سلولی تعریف می‌شود. از نظر پاتولوژیکی، این حالت با نسبت سلول‌های دارای چرخه سلولی فعال به میزان بیش از میزان مورد انتظار از بافت طبیعی که از آن به‌وجود آمده است، مشخص می‌شود. لذا نسبت بیشتری از سلول‌ها در حالت میتوز، قابل تشخیص به‌طریق میکروسکوپی، و در فاز S قرار دارند.
>
> برای ایجاد اختلال در همانندسازی از داروهای زیادی استفاده می‌شود. آنتی‌متابولیت‌ها با سنتز پیش‌سازهای 5′−NTPs تداخل می‌کنند. متو-ترکسات دی‌هیدروفولات ردوکتاز را مهار می‌کند که برای حفظ تتراهیدروفولات احیاءشده مورد نیاز است که خود برای سنتز نوکلئوتید لازم می‌باشد. ۵- فلورواوراسیل آنزیم تیمیدیلات سنتاز را مهار می‌کند؛ بعد از تبدیل به شکل تری‌فسفاتی خود، این ترکیب می‌تواند در داخل DNA قرار گرفته و سبب شکست رشته شود. آلکالوئیدهای وینکا[1] همایش میکروتوبولی را مهار نموده و به موجب آن با میتوز و جداشدن کروموزومی تداخل می‌کنند. مهارکننده‌های توپوایزومراز فرایند همانندسازی را از طریق مهار بازشدن رشته‌های مادری، آهسته و یا متوقف می‌سازند. سموم توپوایزومراز مانع شکل‌گیری مجدد پیوند فسفودی‌استری شده و اتصالات کووالان DNA-پروتئینی را باقی می‌گذارند که به شکست‌های زنجیر تبدیل می‌شوند؛ این کلاس عوامل ضد نئوپلاسم شامل اتوپوزید[2] و دوکسوروبیسین[3] می‌باشند.
>
> 1. Vinca alkaloides
> 2. Etoposide
> 3. Doxorubicin

1. Missegregation
2. Licensing
3. Licensing factor
4. Matchmarker
5. Cell division cycle protein 6
6. Chromatin licensing and DNA replication factor 1
7. Cyclin-dependent kinase
8. Dbf4-dependent kinase
9. Geminin

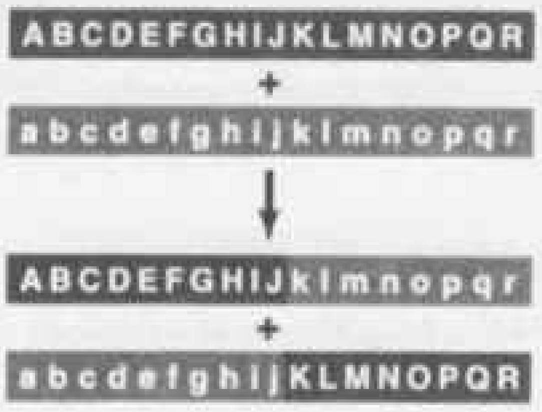
برای زنده ماندن سلول لازم است قبل از میتوز همانندسازی به‌طور کامل انجام شود. سلول‌ها مکانیسم‌های تنظیمی دارند که از طریق آنها هماهنگی بین حوادث چرخه سلولی را در چندین نقطه‌وارسی[1] تضمین می‌کنند. در طی فرایند همانندسازی، سلول‌ها بیشترین حساسیت را نسبت به آسیب DNA دارند، زیرا احتمال دارد چنگال همانندسازی با آسیبی مواجه شود که قبلا ترمیم نشده است (ارتباط بالینی ۴-۴). سلول‌ها حسگرهایی را برای شناسایی آسیب DNA و توقف چرخه سلولی در مرز G1/S یا مرز G2/M به‌وجود آورده‌اند. در صورتی‌که سلول در فاز S قرار داشته باشد، توقف چنگال‌های همانندسازی مانع رخدادهای شروع دیگر در این فاز می‌شوند. حسگرهای آسیب همچنین سبب القاء سنتز پروتئین‌هایی می‌گردند که به ترمیم DNA کمک می‌کنند. به نظر می‌رسد PCNA، RFC، RPA و pol ε نقش‌های مهمی را در شناسایی آسیبی که مانع همانندسازی می‌شود و همچنین در هماهنگی همانندسازی و ترمیم دارند. به نظر می‌رسد تعامل PCNA با $p21^{cip1}$ که یک مهارکننده کیناز وابسته به سیکلین است، سبب مهار همانندسازی، ولی نه ترمیم، می‌شود؛ لذا ممکن است قبل از ادامه همانندسازی، اجازه پیشرفت ترمیم را بدهد. نقص در چندین ژنی که برای این پاسخ نقطه وارسی مهم هستند، نظیر ATM، TP53 و CHK2، سبب افزایش ناپایداری ژنومیک و خطر سرطان می‌شود.

همانندسازی ژنوم‌های RNA

برخی ویروس‌ها یک ژنوم RNA دارند. این ژنوم‌ها با صحت بسیار کمتری همانندسازی می‌شوند و تجمع تغییرات در آنها می‌تواند نسبتاً سریع باشد. یک مثال به‌خصوص مهم در این مورد، **ویروس نقص ایمنی انسان**[2] (HIV) می‌باشد که سبب **سندروم نقص ایمنی اکتسابی**[3] (AIDS) می‌شود. RNA ویروسی HIV به DNA رونویسی معکوس شده و سپس DNA حاصل در داخل کروموزوم قرار داده می‌شود. ترانس‌کریپتاز معکوس HIV یکی از اهداف درمان ضدویروسی است (ارتباط بالینی ۲-۴ را ببینید).

رونویسی معکوس ژنوم RNA ویروس HIV صحت بسیار کمتری نسبت به سنتز DNA دارد و این کاهش صحت منجر به تولید سریع مجموعه‌هایی از ویروس‌های واریانت در یک فرد می‌شود. کسر کوچکی از این واریانت‌ها احتمالاً مقاوم به هر دارویی است که به تنهایی برای درمان این عفونت مورد استفاده قرار می‌گیرد. این کسر می‌تواند در حضور عامل درمانی به همانندسازی ادامه داده و به واریانت‌های غالب تبدیل شود؛ نتیجه کاهش کارایی دارو می‌باشد. درمان‌های ترکیبی اخیر برای کاهش احتمال ایجاد مقاومت همزمان یک ویروس به تمامی داروهای موجود در ترکیب، طراحی می‌شوند. درمان‌های ترکیبی اخیر هم بر علیه ترانس کریپتاز HIV و هم بر علیه پروتئاز HIV می‌باشند.

1. Checkpoint 2. Human immunodeficiency virus 3. Acquired immune deficiency syndrome



شکل ۱۹-۴ نوترکیبی هُمولوگوس. (*a*)کروموزوم پدری با رنگ آبی و آلل‌های آن با حروف بزرگ نشان داده شده‌اند. کروموزوم مادری هُمولوگوس با رنگ قرمز و آلل‌های آن با حروف کوچک نشان داده شده‌اند. (*b*) بعد از نوترکیبی هُمولوگوس بین دو ژن *j* و *k* هر دو کروموزوم حاوی DNA از هر دو والد می‌باشند. تبادل متقابل برابر بین آن دو رخ داده است.

۴-۴ • نوترکیبی

نوترکیبی تبادل اطلاعات ژنتیکی است. دو نوع اصلی نوترکیبی وجود دارد: **نوترکیبی هُمولوگوس**[1] و **نوترکیبی هترولوگوس**[2]. نوترکیبی هُمولوگوس (**نوترکیبی عمومی** نیز نامیده می‌شود) بین توالی‌های یکسان یا تقریباً یکسان، برای مثال بین کروموزوم‌های مادری و پدری یک جفت، صورت می‌پذیرد. کروموزوم‌ها به صورت دست‌نخورده از یک نسل به نسل دیگر منتقل نمی‌شوند (شکل ۱۹-۴)؛ در عوض، هر کروموزومی که از پدر به ارث می‌رسد قسمت‌هایی از هر دو والد را دارد و در مورد کروموزوم‌های به ارث رسیده از مادر نیز همین طور است. گاهی نوترکیبی بین کروموزوم‌های مختلف رخ می‌دهد که اغلب به‌واسطه آسیب واردشده به یک کروموزوم، مثلا یک شکست دو-رشته، آغاز می‌شود. این نوترکیبی می‌تواند منجر به مرگ شود (ارتباط بالینی ۵-۴).

نوترکیبی هُمولوگوس متقابل است که طی آن قسمتی از یک کروموزوم به کروموزوم دیگر انتقال یافته و برعکس. این نوترکیبی سبب بُرخوردن ژن‌ها قبل از انتقال به نسل بعد می‌شود که نتیجه آن تنوع ژنتیکی می‌باشد. این بخش طبیعی از فرایند به‌صف‌درآمدن و جداشدن کروموزوم است که خود برای تضمین این موضوع مهم می‌باشد که هر سلول زایا در هنگام میوز یک مجموعه واحد هاپلوئید کروموزوم‌ها را دریافت کند. احتمال رخداد یک حادثه نوترکیبی بین دو نقطه موجود بر روی یک کروموزوم تقریباً متناسب با فاصله فیزیکی بین آنها می‌باشد. این اساس نقشه‌برداری ژنتیکی است. یک فراوانی ۱٪ نوترکیبی بین دو ژن یا مارکر به صورت فاصله ژنتیکی یک **سانتی‌مورگان**[3] (cM) تعریف می‌شود. در انسان، ۱ cM تقریباً معادل ۱,۰۰۰,۰۰۰ جفت باز در طول کروموزوم می‌باشد.

نوترکیبی هُمولوگوس

سه مدل اصلی برای نوترکیبی هُمولوگوس وجود دارد (جدول ۳-۴). این مدل‌ها به طرق مختلف با یکدیگر ارتباط دارند و ترکیب واسط مشترکی به‌نام **اتصال هالیدی**[4] دارند. ساده‌ترین اینها، مدل هالیدی است؛ شناخت نکات کلیدی این مدل به تمایز ساده‌تر آن از سایر مدل‌ها کمک می‌کند.

مدل هالیدی

خصوصیات کلیدی **مدل هالیدی** شامل (a) هُمولوژی (b) تقارن هر دو شکست و تهاجم رشته، و (c) وجود یک «اتصال هالیدی» چهار-رشته به عنوان یک ترکیب واسط کلیدی می‌باشد (جدول ۳-۴). در این مدل، نوترکیبی با یک جفت شکست تک-رشته در موقعیت‌های هُمولوگوس در دو مارپیچ دورشته DNA به‌صف درآمده آغاز می‌شود (شکل ۲۰-۴). قسمتی از رشته‌های هر مارپیچ دوتایی باز شده و هر کدام به دورشته مخالف «تهاجم می‌کند».

1. Homologous recombination 2. Heterologous recombination 3. Centimorgan 4. Holliday junction

ارتباط بالینی ۵-۴

نوترکیبی و سرطان

خطاهای نوترکیبی می‌توانند منجر به دو برابر شدن ژنی یا حذف، امتداد سه‌نوکلئوتیدی، ادغام ژنی و نوآرایی‌های کروموزومی شوند. فراوانی حوادث نوترکیبی با آسیب DNA افزایش می‌یابد که تا حدودی به‌دلیل ایجاد اختلال در چنگال‌های همانندسازی و قسمتی به‌دلیل ایجاد شکست در DNA است. نوترکیبی می‌تواند بین توالی‌های مرتبط ولی نه یکسان در داخل یک کروموزوم یا بین کروموزوم‌ها رخ دهد. نوترکیبی همچنین می‌تواند توسط اتصال انتهایی غیرهُمولوگوس به‌دنبال یک شکست دو-رشته در DNA رخ دهد. برخی اشکال سرطان توسط نوآرایی‌های کروموزومی اختصاصی آغاز می‌شوند که منجر به ادغام‌های ژنی می‌شوند که اونکوژن‌ها را به‌وجود می‌آورند. لوسمی میلوئید مزمن (CML) و لوسمی لنفوسیتی حاد (AML) می‌توانند حاصل جابه‌جایی‌هایی بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ باشند که پروتئین‌های ادغامی را بین ژن‌های BCR و ABL به‌وجود می‌آورند. پروتئین ادغامی BCR-ABL یک تیروزین کیناز فعال است که به‌عنوان یک اونکوژن عمل می‌کند.

جدول ۳-۴ • نوترکیبی هُمولوگوس

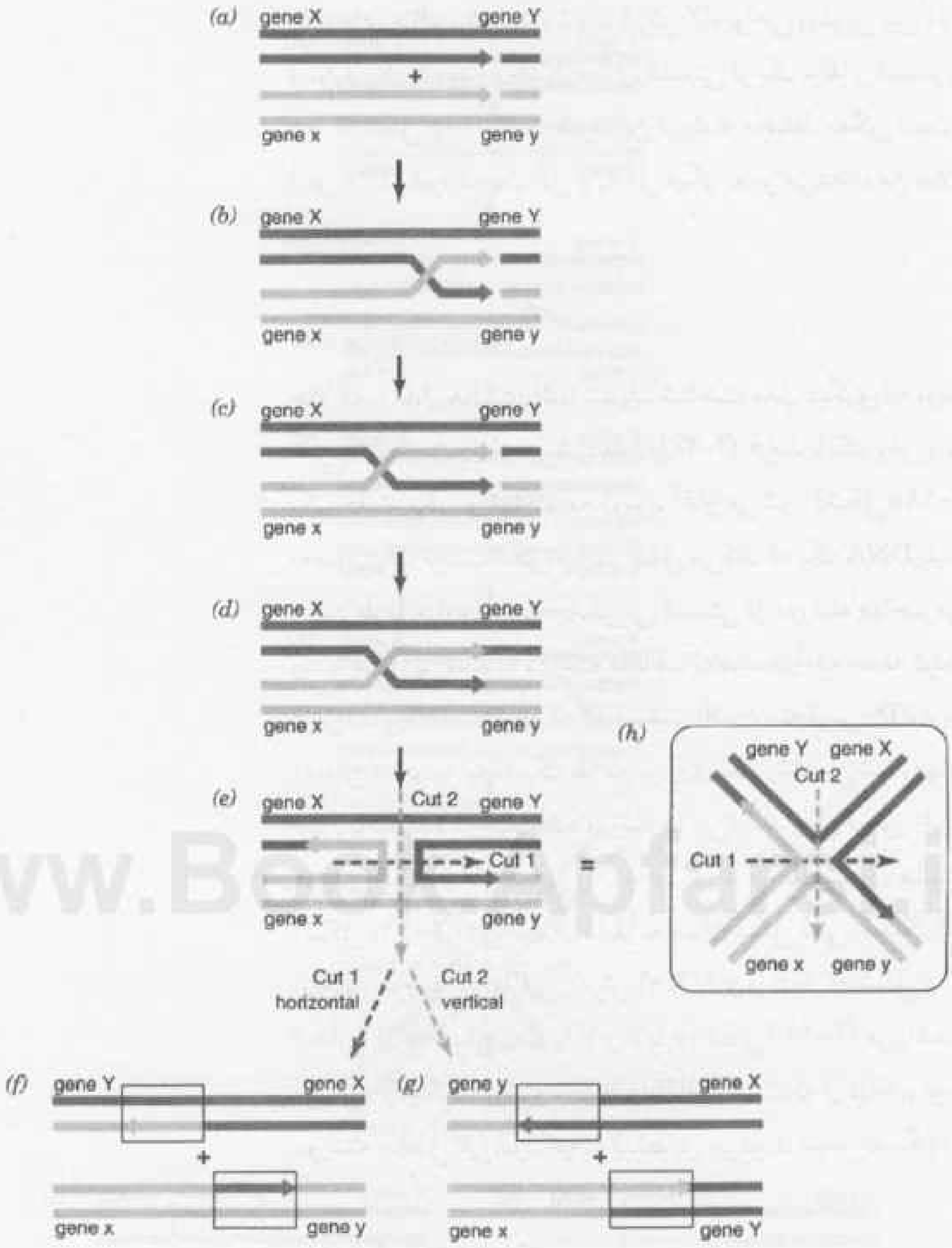
	مدل هالیدی	مدل مزلسون- رادینگ	مدل شکست دو- رشته
هُمولوژی	بلی	بلی	بلی
شروع	دو برش تک رشته در موقعیت‌های هُمولوگوس	یک برش تک رشته	یک شکست دو رشته، انتهاها برداشت می‌شوند
تهاجم رشته	یک رشته از هر دو رشته به رشته متقابل حمل می‌کند	برش امتدادیافته واحد به دو رشته دیگر حمله می‌کند	۱ یا ۲ رشته به دورشته دیگر حمله می‌کند
مهاجرت شاخه	بلی	بلی	بلی
ترکیب واسط کلیدی	اتصال هالیدی	اتصال هالیدی	۲ اتصال هالیدی
تولید دو رشته مخلوط	بلی - متقارن	بلی - نامتقارن	بلی - نامتقارن و بلند

یعنی، قسمتی از یک رشته از هر دورشته به طریق متقابل و قرینه با دورشته مخالف جفت می‌شود. این رشته‌ها می‌توانند به شکل کووالان به دورشته مخالف اتصال یافته و تولید یک ملکول اتصالی کنند که در آن دو رشته بین دو ملکول DNA ایجاد تقاطع می‌کنند.

سپس **مهاجرت شاخه**[1] رخ می‌دهد (شکل c ۲۰-۴)؛ مهاجرت شاخه عبارتست از باز و بسته‌شدن دو مارپیچ دورشته به‌طوری که تعداد کل پیوندهای هیدروژنی ثابت باقی بماند، ولی محل تقاطع حرکت کند. از آنجایی که تعداد پیوندهای هیدروژنی ثابت باقی می‌ماند و چرخش ملکول استوانه‌ای نازک DNA حول محورش ساده است، مهاجرت شاخه نیاز به انرژی کمی دارد. مهاجرت شاخه سبب ایجاد ناحیه دورشته مختلطی[2] می‌شود که در آن یک رشته از دورشته ابتدایی و رشته دیگر از دورشته دوم می‌باشد. در انسان، دو فرد تقریباً از نظر یک جفت باز در هر هزار جفت باز با یکدیگر اختلاف دارند؛ هر ناحیه دورشته مختلط اغلب حاوی یک جفت باز بدتطابق است.

رشته‌های متقاطع اتصال کووالان با دورشته دیگر دارند (شکل c ۲۰-۴). دو دورشته DNAای که از طریق یک نقطه تقاطع به یکدیگر متصل شده‌اند، به همان شکلی که در شکل e ۲۰-۴ و h نشان داده شده است، می‌توانند چرخیده و یک اتصال هالیدی چهار- رشته به‌وجود آورند. تفکیک این ساختمان به دو دورشته می‌تواند به یکی از دو طریقی انجام شود که به‌صورت برش‌های عمودی و افقی در شکل e ۲۰-۴ نشان داده شده‌اند. در صورتی که رشته‌های متقاطع برش داده شوند (برش ۱)، نشانگرهای موجود در دو طرف ناحیه دورشته مختلط (X با Y و x با y؛ قسمت f) به همان شکل ابتدایی در یک فاز متصل به یکدیگر باقی می‌مانند؛ در سطح بزرگ‌تر، کروموزوم‌ها تغییر نمی‌کنند. در صورتی که

1. Branch migration 2. Heteroduplex



شکل ۲۰-۴ مدل هالیدی نوترکیبی هُمولوگوس. (a) سیناپس (جفت‌شدن)؛ دو DNA هُمولوگوس به شکل مناسبی در کنار یکدیگر به صف درمی‌آیند. (X، x و Y، y آلل‌های مختلف مربوط به ژن‌های X و Y هستند که هر کدام از آنها در یک سمت کراس‌اُور قرار دارند.) شکست‌های تک-رشته در موقعیت‌های هُمولوگوس در رشته‌های با قطبیت یکسان در هر دو رشته ایجاد می‌شود. (b) قسمتی از رشته‌ها باز شده و به‌طور متقابل به ملکول مقابل «تهاجم نموده» (ایجاد جفت باز کرده) تا ساختمانی تولید شود که در آن دو رشته سالم از طریق دو رشته متقاطع به یکدیگر متصل می‌باشند. این یک رخداد قرینه و متقابل می‌باشد. نواحی که در آن یک رشته از یک دورشته و رشته دیگر از دورشته هُمولوگوس است، دو رشته‌ها مختلط نامیده می‌شوند. (c) مهاجرت شاخه رخ می‌دهد. (d) DNA لیگاز برش‌ها را می‌دوزد. هر چهار رشته در یک نقطه کراس‌اُور در کنار یکدیگر قرار داده می‌شوند. (e) با چرخش این ساختمان تولید یک ترکیب واسط هالیدی می‌شود که در شکل گوشه (h) نشان داده شده است. (f و g) تفکیک: ملکول‌ها با یک جفت برش قرینه در هر دو جهت (پیکان‌های صورتی و نارنجی) جدا می‌شوند. انتهاها توسط لیگاز دوخته می‌شوند. جهت برش‌ها تعیین می‌کنند که آیا نواحی پهلویی تبادیل می‌شوند یا خیر. (f) در صورتی که رشته‌های متقاطع بریده شوند (برش ۱، افقی)، ژن‌های پهلویی به صورت آن چیزی می‌مانند که وجود داشتند (XY/xy). نوترکیبی بین این لوکوس‌ها را پیدا نخواهید کرد. (g) در صورتی‌که رشته‌های والدین غیرمتقاطع بریده شوند (برش ۲، عمودی)، ژن‌ها یا مارکرهای پهلویی تبادل خواهند شد (Xx/Yy). این حالت به عنوان یک رخداد نوترکیبی جستجو می‌شود. توجه داشته باشید که در هر صورت ناحیه‌ای (حاوی کادر) با دورشته مختلط وجود دارد؛ ترمیم بدتطابق در این ناحیه می‌تواند منجر به تبدیل ژنی شود.

رشته‌های سالم برش داده شوند (برش ۲)، نواحی پهلویی بین دو کروموزوم معاوضه شده و تولید یک کروموزوم جدید حاوی قسمتی از یک والد و قسمتی از والد دیگر (X با y و x و Y؛ شکل g۲۰-۴) می‌شود. این دورشته مختلط ممکن است متحمل ترمیم بدتطابق (ص ۲۳۷) شود که یک آلل را به آلل دیگر تغییر می‌دهد، فرایندی که **برگردانی ژن**[1] نامیده می‌شود.

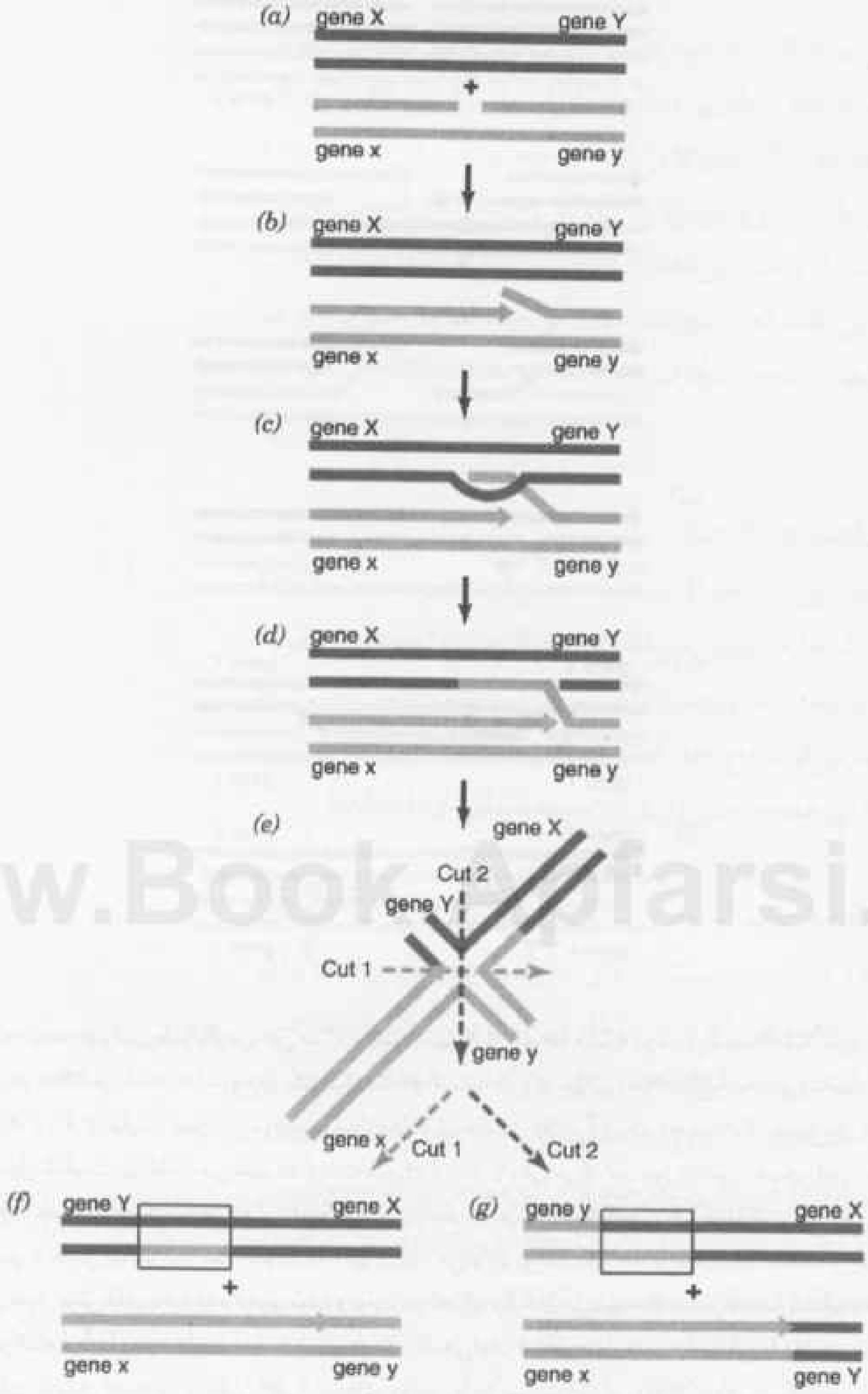
مدل مزلسون-رادینگ

حالا که با مدل هالیدی آشنا شدید، شناخت مدل دیگری که توسط مزلسون[2] و رادینگ[3] مطرح شده است، ساده می‌شود (جدول ۳-۴). فرایند با یک برش و یک رشته مهاجم، به‌جای یک جفت برش و تهاجم معکوس، آغاز می‌شود (شکل *a*۲۱-۴). رشته برش‌داده‌شده به‌عنوان یک ترکیب الگو-پرایمر عمل می‌کند که یک DNA پلیمراز آن را امتداد می‌دهد و این طویل‌سازی سبب جایگزینی قسمتی از دورشته مهاجم می‌شود (شکل *b*۲۱-۴). رشته جایگزین‌شده به دورشته مخالف به‌صف‌درآمده حمله کرده و تولید ساختمانی به‌نام قوس D می‌کند (شکل *c*۲۱-۴). قسمت تک-رشته قوس D-تخریب شده و سنتز ترمیمی و دوختن منجر به ایجاد یک تقاطع بر روی یک رشته می‌شود. مهاجرت شاخه رخ می‌دهد. برش باقیمانده دوخته شده و رشته‌ها می‌توانند روی محور خود چرخیده و یک اتصال هالیدی یکسان با اتصالی را به‌وجود آورند که برای مدل هالیدی قبلی شرح داده شد (شکل *e*۲۱-۴)؛ این اتصال دقیقاً به همان شکل قبلی تفکیک‌شده که نتیجه آن تعویض ژن‌های موجود در طرفین (برش ۲: X با y و x با Y؛ شکل g۲۱-۴) یا کونفیگوراسیون ابتدایی ژن‌ها (برش ۱: X با Y و x با y؛ شکل *f* ۲۱-۴) می‌باشد. تفاوت کلیدی در **مدل مزلسون-رادینگ**، دورشته مختلط نامتقارنی است که از تهاجم توسط یکی از رشته‌های دو دورشته حاصل می‌شود. ترمیم بدتطابق می‌تواند منجر به برگردانی ژن شود.

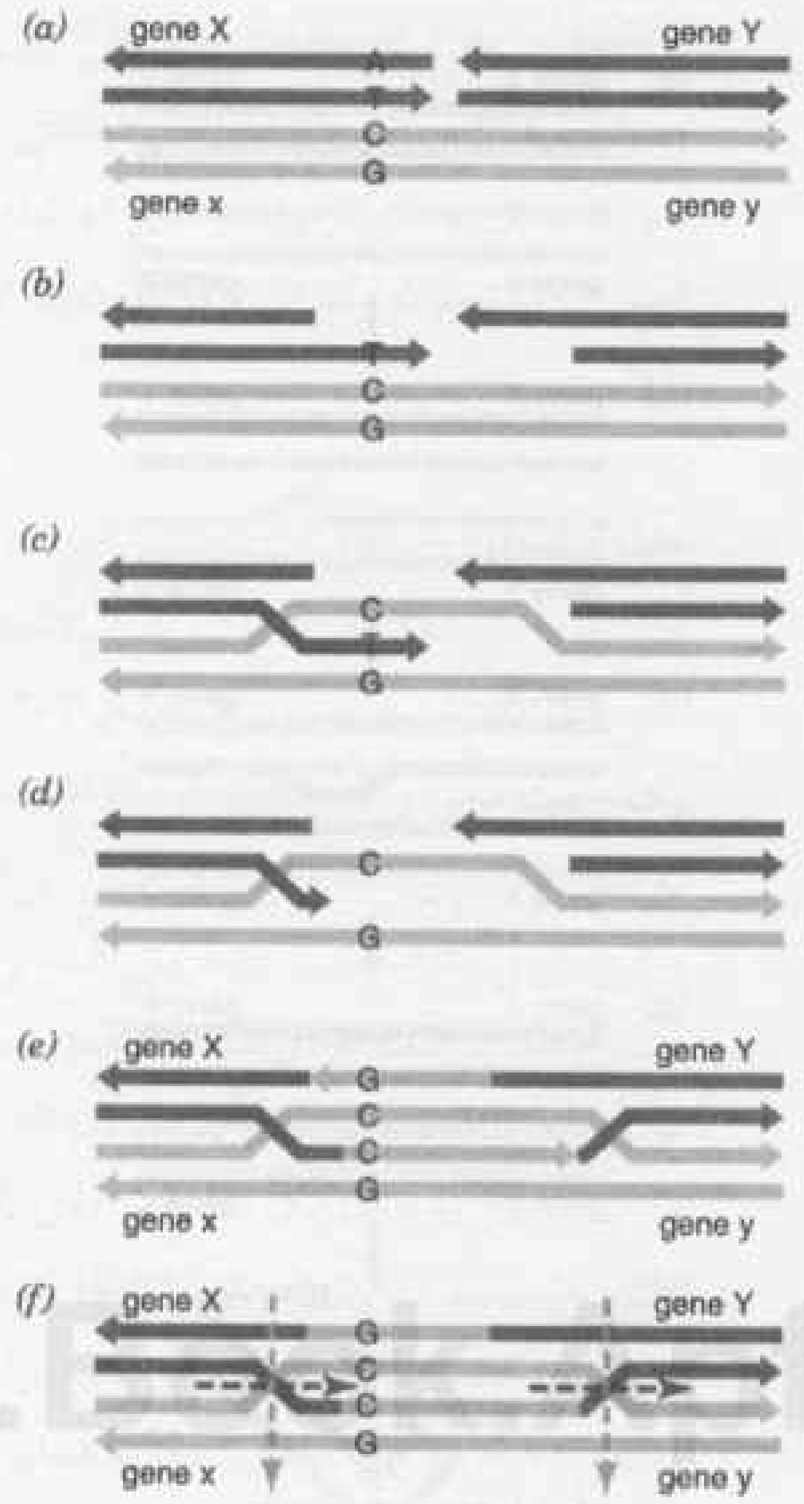
مدل شکست دو-رشته

مدل سوم یک مدل شکست دو-رشته[4] می‌باشد (جدول ۳-۴). در این مدل، نوترکیبی با یک شکست دو-رشته در یک دورشته آغاز می‌شود (شکل *a*۲۲-۴). انتهاها کوتاه شده (شکل *b*۲۲-۴) که نتیجه آن حذف اطلاعات ژنتیکی از یکی از دو دورشته می‌باشد. اشکال متفاوتی برای این مدل وجود دارد. در یکی از آنها، دو قطعه تک-رشته دورشته شکسته شده به دورشته سالم حمله کرده و یک ملکول اتصالی تولید می‌کنند که دو اتصال هالیدی دارد. انتهاهای بریده‌شده توسط یک پلیمراز، با استفاده از یک رشته سالم به‌عنوان الگو، و یک DNA لیگاز ترمیم می‌شوند. مهاجرت شاخه همانند مدل‌های قبلی رخ می‌دهد. در مدل دیگر، انتهای ′۳ یکی از دو سمت برش به رشته دیگر حمله کرده و یک قوس D

1. Gene conversion 2. Meselson 3. Radding 4. Double-Strand Break



شکل ۲۱-۴ مدل مزلسون - رادلینگ نوترکیبی هُمولوگوس. این مدل مشابه مدل هالیدی است، ولی شروع با یک برش و یک رشته مهاجم می‌باشد. (a)سیناپس (جفت‌شدن)؛ دو ملکول هُمولوگوس به شکل مناسبی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. یک شکست تک - رشته بر روی یک رشته انجام می‌شود. (b) انتهای 3′ – OH توسط یک DNA پلیمراز امتداد داده می‌شود که سبب جایگزینی انتهای 5′ می‌شود. (c) انتهای 5′ آزاد به دورشته هُمولوگوس تهاجم نموده و یک قوس D به وجود می‌آورد. (d) این قوس D تخریب شده و سنتز ترمیمی به همراه دوختن توسط DNA لیگاز منجر به تولید ملکولی می‌شود که در آن یک رشته بین دورشته‌ها تقاطع ایجاد می‌کند. با افزایش طول یک رشته (نشان داده نشده است)، مهاجرت شاخه رخ می‌دهد. رشته امتدادیافته کراس اُور ایجاد کرده و به دورشته مخالف اتصال می‌یابد تا همانند شکل ۲۰-۴ تمامی چهار رشته در یک نقطه کراس‌اُور متصل بمانند. (e) رشته‌ها چرخش نموده تا تولید یک اتصال هالیدی دقیقاً همانند شکل ۲۰-۴ e و h شود. اتصال هالیدی به دو طریق می‌تواند از بین برود و تبادل نواحی پهلویی توسط جهت برش تعیین می‌شود. توجه داشته باشید که در هر صورت ناحیه‌ای از دورشته مختلط وجود دارد (در داخل کادر)، ولی متقابل نیست؛ این تنها بر روی یک دورشته است. ترمیم بدتطابق در این ناحیه می‌تواند سبب برگردانی ژن شود.



شکل ۲۲-۴ مدل شکست دو- رشته نوترکیبی هُمولوگوس. این مدل از نظر بسیاری از جنبه‌ها مشابه دو مدلی است که قبلاً مورد بحث قرار گرفتند، ولی شروع توسط یک شکست دو-رشته در یکی از دو DNA می‌باشد. (a) شروع با یک شکست دو- رشته در یک ملکول DNA می‌باشد. دورشته‌های به‌صف‌درآمده نشان داده شده‌اند؛ ژن‌های پهلویی آلل‌های متفاوتی (X، x ؛ Y، y) دارند. همچنین موقعیتی نشان داده شده است که در آن یک دورشته یک جفت باز AT و دیگری یک جفت باز GC دارد. (b) DNA توسط اگزونوکلئازی از محل شکست برداشت می‌شود که آویخته‌های OH – ′۳ را باقی می‌گذارد. این برداشت ممکن است منجر به برداشت یکی از نوکلئوتیدها در محلی شود که بین دو رشته متفاوت هستند. (c) یکی یا هر دو این آویخته‌ها می‌توانند به دورشته هُمولوگوس سالم حمله کنند. (d) جایی‌که یک بدتطابق وجود دارد، انتهای آزاد می‌تواند توسط آنزیم‌های ترمیم بدتطابق بیشتر برداشت شوند. (e) انتهای آزاد می‌تواند توسط یک DNA پلیمراز و با استفاده از رشته تخریب‌نشده به‌عنوان الگو امتداد داده شده و منجر به برگردانی ژنی شود. برش‌های باقیمانده ترمیم شده و تولید دو اتصال هالیدی می‌شود. (f) سپس هر دو اتصال هالیدی تفکیک می‌شوند. از آنجایی‌که دو اتصال و دو راه برای تفکیک هر کدام از آنها وجود دارد (همانند شکل h -۲-۴)، می‌توان انتظار چهار نتیجه احتمالی را داشت. دو مورد از این چهار راه احتمالی برای تفکیک اتصالات هالیدی (برش‌های عمودی /عمودی یا افقی / افقی)، ژن‌های پهلویی را به صورت ابتدایی (XY/xy) باقی می‌گذارند. دو راه دیگر تفکیک اتصالات هالیدی منجر به تبادل ژن‌های پهلویی (Xy/xY) می‌شود. تفکیک می‌تواند توسط توپوایزومراز نیز صورت گیرد.

به‌وجود می‌آورد که نسخه‌برداری دورشته سالم را دنبال می‌کند. نتیجه می‌تواند یک حباب همانندسازی کوچک با سنتز بر روی هر دو رشته برای یک فاصله کوتاه و تفکیک در زمان رسیدن حباب به سمت دیگر شکست باشد. این فرایند می‌تواند منجر به برگردانی ژنی وسیع شود.

تفکیک دو اتصال هالیدی به‌واسطه یک جفت برش انجام می شود (شکل f۲۲-۴). از آنجایی که دو جهت احتمالی برای تفکیک هر اتصال وجود دارد، چهار نتیجه احتمالی ممکن می‌باشد. در دو حالت، ژن‌های پهلویی در کونفیگوراسیون ابتدایی کنار یکدیگر می‌مانند (X با Y و x با y) و در دو حالت تعویض ژن‌های پهلویی رخ می‌دهد (X با y و x با Y). تفکیک می‌تواند توسط یک توپوایزومراز نوع II نیز رخ دهد. از آنجایی که یک دورشته DNA در ناحیه شکست از دست می‌دهد، برای بستن شکاف نیاز به اطلاعات ژنتیکی برای هر دو کروموزوم می‌باشد که از دورشته سالم می‌آیند؛ لذا در صورتی که هر نوع تفاوت توالی بین کروموزوم‌ها در ناحیه شکاف وجود داشته باشد، آنگاه برگردانی ژن رخ می‌دهد.

پروتئین‌های کلیدی نوترکیبی در *E.coli*

RecA پروتئین کلیدی فرایند نوترکیبی در *E.coli* است که به طریق تعاونی به یک DNA تک-رشته اتصال یافته و تولید یک فنر مارپیچی می‌کند. این اتصال سبب تسهیل در جفت‌شدن تک رشته با یک DNA دورشته هُمولوگوس در جهت تولید یک ساختمان قوس D سه-رشته می‌شود. سوییچ رشته می‌تواند رخ دهد که نتیجه آن یک DNA دورشته مخلوط می‌باشد. اوکاریوت‌ها پروتئین‌های هُمولوگوسی دارند که نسخه انسانی آن RAD51 نامیده می‌شود.

RecBCD کمپلکسی در *E.coli* با فعالیت‌های متعدد است. این کمپلکس به یک شکست دو-رشته اتصال یافته و آن را به سوبسترایی برای نوترکیبی پردازش می‌کند؛ برای این منظور، کمپلکس DNA را به عقب می‌راند و در هنگام مواجه با یک توالی اختصاصی به‌نام جایگاه χ، یک تک رشته امتدادیافته با OH-'۳ باقی می‌گذارد. **RecA** می‌تواند به این تک رشته اتصال‌یافته و جفت‌شدن با دورشته هُمولوگوس را آغاز کند. **RuvA** و **RuvB** کمپلکسی را با فعالیت DNA هلیکازی به‌وجود آورد که مهاجرت شاخه وسیع را کاتالیز می‌کند که خود مرحله کلیدی در نوترکیبی است. **RuvC** آندونوکلئازی است که به این کمپلکس اتصال یافته و تفکیک اتصالات هالیدی را کاتالیز می‌نماید.

نوترکیبی غیرهُمولوگوس

نوترکیبی اختصاصی-جایگاه

در نوترکیبی اختصاصی-جایگاه[1]، آنزیم‌های تخصص‌یافته‌ای سبب اینتگراسیون[2] (قرارگیری) یک توالی در داخل جایگاه‌های خاصی در DNA می‌شوند. اینتگراسیون باکتریوفاژ λ در داخل کروموزوم *E.coli* بهترین نمونه مطالعه‌شده می‌باشد. **λ-اینتگراز** برش اختصاصی λDNA و یک توالی اختصاصی موجود در کروموزوم *E.coli* را کاتالیز می‌کند و همچنین

1. Site-specific recombination 2. Integration

در کاتالیز دوخت مجدد نقش دارد. این فرایند برگشت‌پذیر است؛ توالی λ اینتگریت‌شده می‌تواند از کروموزوم خارج شود. مثال‌های مهمی برای نوترکیبی اختصاصی -جایگاه وجود دارد که فرایندهایی نظیر برگردانی نوع جفت‌شدن[1] در مخمر و تغییر فاز (تغییراتی در پروتئین سطحی اصلی) در تریپانوزوم‌ها را کنترل می‌کنند. تغییر فاز در تریپانوزوم‌ها به این انگل در فرار از پاسخ ایمنی میزبان کمک می‌کند.

ترانس‌پوزیشن

ترانس‌پوزیشن[2] حرکت قطعاتی از DNA در ژنوم است. دو نوع رخداد ترانس‌پوزیشن وجود دارد، یکی ترانس‌پوزیشن ساده[3] که در آن توالی از محلی در ژنوم بریده شده و در جای دیگر قرار داده می‌شود، و دیگری ترانس‌پوزیشن همانندسازی[4] که در آن یک نسخه از توالی مورد نظر در محل دیگری قرار داده می‌شود، ولی توالی اصلی حذف نمی‌شود. **ترانس پوسازها** آنزیم‌هایی هستند که ترانس‌پوزیشن را کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها **توالی‌های الحاقی**[5] را شناسایی می‌کنند.

برخی قطعات DNA، تحت عنوان **ترانس‌پوسون‌ها**، ترانس‌پوسازهایی را کد می‌کنند که در طرفین آنها توالی‌های الحاقی قرار دارند و می‌توانند تقریباً به هر محلی در یک کروموزوم هدف بروند. گاهی ترانس‌پوسون‌ها در هنگام تغییر مکان، ژن‌های دیگری را با خود حمل می‌کنند. سایر قطعات DNA حاوی توالی‌های الحاقی هستند، ولی ترانس‌پوساز خود را کد نمی‌کنند، اینها زمانی می‌توانند به حرکت درآیند که یک ترانس‌پوساز در محل دیگری بیان شود.

ترانس‌پوسون‌ها می‌توانند به محل‌های جدیدی در داخل یک کروموزوم جابه‌جا شوند و یا در کروموزوم‌های دیگر اینتگریت شوند. کسر قابل توجهی از ژنوم انسانی حاصل تجمع ترانس‌پوسون‌ها و توالی‌های الحاقی هستند. **عناصر متفرق بلند**[6] (**LINEs**، که شایع‌ترین آن L1 است) ترانس‌پوسون‌هایی هستند که به تعداد حدود ۵۰،۰۰۰ نسخه در ژنوم انسانی وجود دارند. توالی‌های Alu از **عناصر متفرق کوتاه**[7] **(SIENs)** هستند که به تعداد حدود ۵۰۰،۰۰۰ نسخه در هر ژنوم هاپلوئید انسانی وجود دارند؛ این توالی‌ها ترانس‌کریپتاز معکوسی را کد نمی‌کنند. برخی جهش‌هایی که منجر به بیماری می‌شوند، ناشی از الحاق یک ترانس-پوسون در داخل یک ژن هستند که کدسازی یا تنظیم آن را تغییر می‌دهند.

رتروترانس‌پوسون‌ها توالی‌هایی هستند که به RNA رونویسی و سپس رونویسی معکوس شده و در یک محل تصادفی در داخل ژنوم اینتگریت می‌شوند. رتروویروس‌ها (با استفاده از **ترانس‌کریپتاز معکوس**، آنزیمی که از RNA نسخه DNA می‌سازد) از ژنوم RNA خود تولید نسخه‌های DNA نموده و سپس این نسخه‌ها را توسط یک اینتگراز کدشده توسط ویروس، در داخل کروموزوم میزبان قرار می‌دهند.

---

1. Mating type conversion
2. Transposition
3. Simple transposition
4. Replicative transposition
5. Insertion sequences
6. Long interspersed elements
7. Short interspersed elements

اتصال انتهای غیرهُمولوگوس

در اتصال انتهای غیرهُمولوگوس[1] (NHEJ؛ گاهی نوترکیبی نادرست[2] نامیده می‌شود) نیاز به هُمولوژی نیست و توالی اختصاصی DNA وجود ندارد. در عوض، دو انتهای شکسته شده یک DNA دورشته می‌توانند با دورشته دیگر، در غیاب هُمولوژی، نوترکیب شوند. این نوترکیبی می‌تواند منجر به ترمیم یک شکست دو-رشته در DNA شود و بنابراین ارزش حیاتی قابل‌توجهی دارد. این نوترکیبی همچنین می‌تواند منجر به جابه‌جایی کروموزومی یا الحاق یک قطعه DNA در هر محلی در ژنوم شود. در سلول‌های پستانداران، هترودیمری به‌نام **Ku** با تمایل بالا به دو انتهای DNA اتصال یافته و می‌تواند در طول DNA حرکت کند. Ku به یک زیرواحد کاتالیتیکی بزرگ پیوسته و تولید **DNA-PK** می‌کند که یک سرین/ترئونین پروتئین کیناز وابسته به DNA است. معتقدند این آنزیم از طریق اتصال به دو انتهای آزاد شکست دو-رشته DNA و به دنبال آن در کنار یکدیگر قراردادن و محافظت آنها در برابر فعالیت نوکلئازی، یک نقش کلیدی در اتصال انتهای غیرهُمولوگوس (NHEJ) بازی می‌کند. این کمپلکس ممکن است دو انتها را باز نموده تا نواحی بسیار کوتاهی از «**میکروهُمولوژی**[3]» (bp ۶-۲) بتوانند جفت شوند. آویخته‌های جفت‌نشده می‌توانند توسط FEN1 برداشت، شکاف‌ها توسط DNA پلیمراز پُر، و برش‌ها توسط DNA لیگاز دوخته شوند. نقص در Ku به دلیل کاهش توانایی در ترمیم شکست‌های دو-رشته‌ای که توسط اشعه-X ایجاد می‌شوند، منجر به حساسیت در برابر اشعه-X می‌شود. از آنجایی که Ku در نوترکیبی V(D)J نیز نقش دارد که خود شکست و اتصال اختصاصی-جایگاه برای همایش ژن‌های ایمو-نوگلبولینی وظیفه‌دار می‌باشد، نقص در Ku همچنین منجر به بیماری کمبود ایمنی مرکب شدید[4] (SCID) می‌گردد.

وقتی ژن‌هایی به داخل سلول‌های پستانداران ارائه می‌شوند، معمولاً از طریق اتصال انتهای غیرهُمولوگوس، به شکل تصادفی در داخل DNA اینتگریت می‌گردند. این اینتگراسیون تصادفی یک قطعه DNA می‌تواند ژن‌ها را قطع نموده و سبب ایجاد جهش یا اختلال در تنظیم شود. لذا احتمال آن وجود دارد که در تلاش برای اصلاح یک مشکل ژنتیکی از طریق الحاق یک ژن، مشکل دیگری به‌وجود آید؛ در حال حاضر این محدودیت اصلی ژن درمانی است (ارتباط بالینی ۶-۴).

ژن‌های کاذب

ژنوم انسان حاوی تعداد زیادی ژن کاذب است که نسخه‌های غیروظیفه‌دار ژن‌ها می‌باشند. این ژن‌ها ممکن است نتیجه رتروترانس‌پوزیشن ملکول‌های mRNA فاقد اینترون و یا رونوشت‌های نسبتاً پردازش‌شده حاوی برخی ولی نه تمامی اینترون‌ها باشند. در حالات

1. Nonhomologous end joining 2. Illegitimate recombination 3. Microhomology
4. Severe combined immunodeficiency disease

ارتباط بالینی ۶-۴

نوترکیبی و ژن درمانی

ژن درمانی ارائه ژن‌های جدید یا تغییریافته به‌داخل سلول‌ها در جهت اصلاح یک نقص ژنتیکی یا درمان یک بیماری می‌باشد. هر چه اطلاعات بیشتری در خصوص بیماری‌های اختصاصی به‌دست می‌آوریم، احتمالات مربوط به‌تداخل ژنتیکی افزایش می‌یابد. ساده‌ترین نوع درمان به طریق ژن درمانی، نوعی است که در آن یک پروتئین موجود در گردش خون از طریق سلول‌هایی قابل تأمین باشد که برای تولید آن مهندسی شده‌اند و نیازی نیست که این سلول‌ها در موقعیت اختصاصی قرار داشته باشند. تولید تنظیم‌شده یک پروتئین نظیر انسولین که می‌تواند توسط سلول‌هایی در هر محلی از بدن تولید شود، قدری مشکل‌تر است. جایگزینی یک ژن ناقص توسط یک نسخه طبیعی در سلول‌های خاصی که در آن بیان می‌شود، بسیار مشکل‌تر خواهد بود.

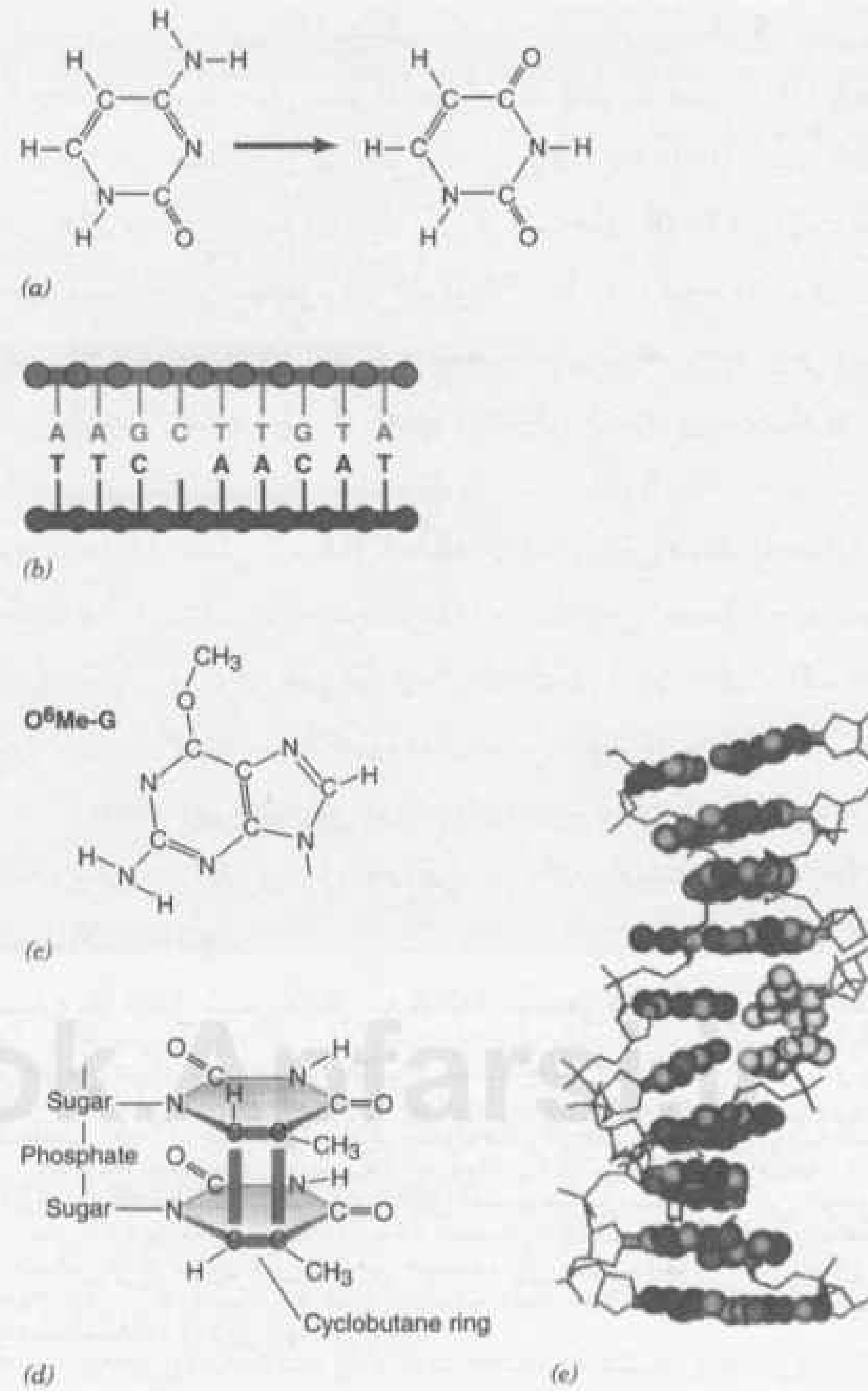
محدودیت‌های اصلی متعددی مانع پیشرفت می‌شوند. یکی از اینها مشکلات مربوط به ارائه ژن‌ها به‌داخل سلول‌های مرتبط می‌باشد؛ این مشکل با انجام کارهای بیشتر بر روی حاملین ارائه ژن و بیولوژی سلول بنیادی در حال برطرف‌شدن می‌باشد. محدودیت دیگر تمایل ژن‌های ارائه‌شونده در قرارگیری تصادفی در داخل ژنوم می‌باشد. در بیشتر مواقع DNAای که به‌داخل سلول‌های پستانداران ارائه می‌شود، به طریق اتصال انتهای غیر-هُمولوگوس (NHE) در داخل ژنوم قرار می‌گیرد. در صورتی‌که ترانس‌ژن در داخل توالی کدکننده یا تنظیمی قرار گیرد، این الحاق تصادفی می‌تواند سبب جهش جدیدی شود. این الحاق همچنین می‌تواند مشکلاتی را در خصوص حفظ بیان ژن در طول زمان به‌وجود آورد، زیرا ژن الحاقی در محل طبیعی در داخل کروموزوم قرار نمی‌گیرد و بنابراین ممکن است به‌واسطه مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی به شکل نامناسبی تنظیم شود.

دیگر، به نظر می‌رسد این ژن‌ها در نتیجه نوترکیبی، نظیر کراسینگ اُور نابرابر، به‌وجود آمده و حاوی اینترون‌ها باشند. اغلب این ژن‌های کاذب، به دلیل وجود جهش‌های بدمعنی و بی‌معنی و یا به‌دلیل تغییر توالی‌های لازم برای شروع رونویسی، غیرـوظیفه‌دار هستند (ص ۲۲۹). در هر صورت، رتروترانس‌پوزیشن و کراسینگ اُور نابرابر، ماده خام تکامل را فراهم می‌سازند که طی آن تجمع تغییرات ژنتیکی سبب می‌شود تا نسخه ژن عملکردهای دیگری را برعهده بگیرد.

۵-۴ • آسیب DNA و جهش

DNA سلولی دائماً در حال آسیب‌دیدن به‌واسطه اجزاء سلولی نظیر گونه‌های فعال واکنشگر و محصولات فرعی متابولیسم هستند. بسیاری از عوامل محیطی و مواد شیمیایی موجود در غذاها به DNA حمله کرده و آن را تغییر می‌دهند. آسیب DNA می‌تواند سبب توقف فرایندهای ضروری نظیر همانندسازی DNA و رونویسی شده و می‌تواند منتهی به جهش گردد.

در محلول آبی در ۳۷°C، احتمال دارد بازهای A ،C و G موجود در DNA متحمل **دآمیناسیون** خودبه‌خودی شوند. C به U، A به هیپوگزانتین و G به گزانتین دآمینه می‌گردد (شکل ۲۳a-۴). **دپوریناسیون خودبه‌خودی** ناشی از شکست پیوند گلیکوزیل متصل‌کننده پورین‌ها به اسکلت DNA می‌باشد که آسیبی به این اسکلت وارد نکرده (شکل ۲۳b-۴) و با یک سرعت قابل‌توجه رخ می‌دهد. برآورد می‌شود که در هر ۲۴ ساعت بین ۲,۰۰۰ تا



شکل ۲۳-۴ آسیب DNA. (a) دآمیناسیون اکسیداتیو سبب تبدیل C به U می‌شود. (b) جایگاه AP. دپوریناسیون (یا، با فراوانی کمتر، دپیریمیدیناسیون) تجزیه پیوند گلیکوزیل بین موقعیت ۱' قند و باز می‌باشد. بدین‌ترتیب جایگاه آبازی (فاقد باز) یا AP حاصل می‌شود، ولی اسکلت قند-فسفات نمی‌شکند. (c) O^6 متیل‌گوانین یک ضایعه شدیداً جهش‌زا است. (d) نور ماوراء بنفش منجر به ایجاد اتصالات عرضی بین پیریمیدین‌ها در طول یک رشته DNA می‌شود. یک دیمر تیمینی cis-syn سیکلوبوتان نشان داده شده است. (e) یک دیمر سیکلوبوتان در داخل DNA دو-رشته نشان داده شده است؛ اسکلت به‌صورت میله‌ای نشان داده شده است تا تغییر شکل بازهای دارای اتصال عرضی (زرد) و بازهای مکمل موجود در رشته دیگر آشکار شود.

۱۰,۰۰۰ پورین در هر سلول پستانداران از دست می‌رود. این محل‌های دپورینه‌شده را **جایگاه‌های AP** یا آبازی[1] (فاقد باز) می‌نامند (در اصل معنی آپورینی[2]، فاقد پورین، است ولی به‌طور عموم برای کمبود هر بازی به‌کار می‌رود).

بازها با سرعت قابل توجهی توسط گونه‌های واکنشگر اکسیژنی اکسیده می‌شوند که محصولات فرعی متابولیسم اکسیداتیو هستند؛ نتیجه تولید بازهای تغییریافته، برای مثال ۸-هیدروکسی‌گوانین (۸-اکسو گوانین؛ شکل ۲۳c-۴) می‌باشد. آسیب اکسیداتیو سبب افزایش سن می‌شود. محصولات پراکسیداسیون لیپیدی می‌توانند محصولاتی را با بازها، به‌خصوص ریشه‌های G، به‌وجود آورند.

عوامل آلکیله‌کننده، شامل برخی از انواعی که در شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار

1. Abasic 2. Apurinic

می‌گیرند، متیل یا گروه‌های آلکیل دیگر را به بازها اضافه می‌کنند. *S*-آدنوزیل‌متیونین که حامل گروه‌های متیل در متابولیسم طبیعی است، گاهی بازهای DNA را متیله می‌کند.

تشعشع ماوراءبنفش (از نور خورشید یا tanning lamp) سبب اتصال کووالان پیریمیدین‌های مجاور موجود در طول یکی از رشته‌های DNA در جهت تولید **دیمرهای پیریمیدینی** سیس-سین سیکلوبوتان[1] (شکل ۲۳*d*-۴ و *e*) و محصولات نوری دیگر، شامل پیریمیدین ۴-۶ پیریمیدون‌ها[2]، می‌شود. تشعشع یونیزان، نظیر اشعه X و زوال رادیواکتیو[3]، منجر به شکست رشته و تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن می‌گردد که به DNA آسیب می‌رسانند.

مواد سرطانزا و جهش‌زا به DNA حمله می‌کنند. برخی مستقیماً عمل می‌کنند و بقیه **پیش-سرطانزا**[4] هستند. پیش-سرطانزاها در حالت بومی (معمول) خود آسیبی به DNA وارد نمی‌کنند، ولی می‌توانند طی فرایندهای متابولیکی (برای مثال، با اکسیداسیون توسط سیتوکروم‌های P450) به سرطانزاهای فعال تبدیل شوند که به DNA آسیب می‌رسانند. این فرایند را **فعال‌سازی متابولیکی** گویند. بنزو (a) پیرن که یکی از ترکیبات قطران زغال[5] است، یک پیش-سرطانزای فوق‌العاده قوی می‌باشد که برای حمله به DNA لازم است به اپوکسید اکسیده شود.

بسیاری از عوامل شیمی‌درمانی به DNA حمله می‌کنند؛ برخی سبب آلکیلاسیون بازها شده و عوامل دیگر نظیر سیس‌پلاتین، سبب ایجاد اتصالات عرضی دو رشته می‌شود (ارتباط بالینی ۷-۴). حساسیت بالاتر سلول‌های درحال همانندسازی به آسیب DNA به معنی آن است که سلول‌های توموری دارای تقسیم سریع، نسبت به این عوامل آسیب‌رسان بسیار حساس‌تر از سلول‌های طبیعی هستند، ولی آسیب آنها به سلول‌های طبیعی سبب محدودیت استفاده و دوز آنها می‌شود.

جهش‌ها

جهش‌ها تغییرات قابل‌وراثت در توالی DNA هستند. این جهش‌ها می‌توانند از خطاهای همانندسازی، از آسیب DNA یا از خطاهای ناشی از ترمیم خطا حاصل شوند. جهش‌هایی که به‌صورت تغییرات یک جفت بازی هستند را **جهش‌های نقطه‌ای** گویند. جهش‌های نقطه‌ای را می‌توان براساس ماهیت باز تغییریافته طبقه‌بندی نمود. **ترانزیشن‌ها**[6] جهش‌های نقطه‌ای هستند که در آنها یک پورین جایگزین پورین دیگر (یعنی، A به‌جای G یا G به‌جای A) یا یک پیریمیدین جایگزین پیریمیدین دیگر (یعنی، T به‌جای C یا C به‌جای T) می‌شود. دآمیناسیون C به U، در صورت عدم ترمیم، منجر به یک ترانزیشن می‌شود. فراوانی ترانزیشن‌ها توسط آنالوگ‌های بازی، شامل ۲-آمینو پورین و ۶-مرکاپتو پورین،

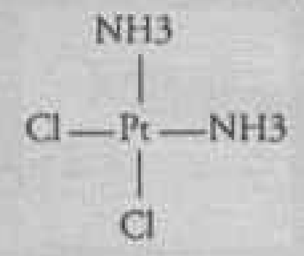
1. Cis-syn cylobutane pyrimidine dimers
2. Pyrimidine 6-4 pyrimidones
3. Radiactive decay
4. Pro-carcinogen
5. Coal tar
6. Transitions

ارتباط بالینی ۷-۴

سیس‌پلاتین و تور فرانسه

بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی که کاربرد گسترده‌ای دارند، عوامل آلکیله کننده‌ای هستند که اغلب دو گروه وظیفه‌دار دارند که می‌توانند در داخل DNA اتصالات عرضی بین زنجیری و درون زنجیری به‌وجود آورند. سیکلوفسفامید، بوسولفان و نیتروزاوره‌ها، جزء عوامل آلکیله‌کننده هستند. عوامل آلکیله‌کننده فقط سیستوتوکسیک نیستند، بلکه جهش‌زا نیز هستند و گاهی منجر به سرطان‌های ثانویه‌ای نظیر لوسمی‌ها می‌شوند.

سیس‌پلاتین (سیس- دی‌آمین‌دی‌کلروپلاتینیوم)،



که در درمان سرطان‌های متاستاتیک بیضه، تخمدان و انواع وسیع دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرد، در DNA ایجاد اتصال عرضی می‌کند. از جمله اثرات جانبی جدی سیس‌پلاتین می‌توان به تخلیه سلول‌های مغز استخوان، اختلال شدید کلیوی و از دست رفتن شنوایی و تعادل اشاره کرد. سرطان بیضه منتشر تقریباً همیشه کشنده بود (میزان بهبودی ۵٪ در سال ۱۹۷۳)، تا این که یک شیمی‌درمانی ترکیبی توسط دکتر لاری اینهورن[1] و دکتر جان دونوهو[2] در دانشکده پزشکی دانشگاه ایندیانا ابداع گردید که در آن سیس- پلاتین به وین‌بلاستین و بلئومایسین اضافه شد؛ این ترکیب جدید به میزان زیادی سبب افزایش طول عمر شد. بعدها این ترکیب دارویی به ترکیب سیس‌پلاتین، اتوپوزید و بلئومایسین تغییر داده شد. امروزه حدود ۸۰٪ بیماران زنده می‌مانند. بعد از درمان سرطان پیشرفته بیضه، دوچرخه سوار جهانی لانس آرمسترانگ[3] موفق به قهرمانی تور فرانسه شد و این موفقیت را هفت بار تکرار کرد.

1. Larry InEinhorn   2. John Donohue   3. Lance Armstrong

افزایش می‌یابد (ارتباط بالینی ۸-۴). ترانزیشن‌ها جهش‌های نقطه‌ای هستند که در آنها یک پورین جایگزین پیریمیدین دیگر می‌شود و برعکس (یعنی، A به جای C یا C به جای A).

جهش‌های نقطه‌ای می‌توانند با اثر خود بر یک توالی کدکننده مشخص شوند. **جهش‌های بدمعنی**[1] جهش‌های نقطه‌ای هستند که یک جفت باز موجود در یک کدون را طوری تغییر می‌دهند که این کدون اسید آمینه متفاوتی را کد کند (شکل ۲۴a-۴). **جهش‌های بی‌معنی**[2] جهش‌های نقطه‌ای هستند که یک جفت باز را در یک کدون طوری تغییر می‌دهند که این کدون به عنوان کدون توقف سبب خاتمه ترجمه می‌شود (شکل ۲۴*b*-۴). جهش‌های بی‌معنی معمولاً اثرات شدیدتری نسبت به جهش‌های بدمعنی دارند، زیرا منجر به سنتز پلی‌پپتیدهای ناقص (و عموماً ناپایدار) می‌شوند. **جهش‌های خاموش هم‌معنی**[3] سبب تغییر اسید آمینه کدشونده نمی‌شوند؛ اینها شامل تغییرات متعددی در نوکلئوتید سوم یک کدون هستند. هرچند در صورت تغییر الگوی اسپلایس یک ژن، برخی جهش‌های خاموش ممکن است نتایج جدی را به‌دنبال داشته باشند.

الحاق یا حذف یک یا چند جفت باز (در صورتی‌که تعداد جفت بازها مضربی از سه نباشد) منجر به **تغییر قالب**[4] می‌شود که خود سبب اختلال در کدنمودن یک پروتئین می‌گردد (شکل ۲۴c-۴ و *d*). ترجمه mRNA فاقد نقطه‌گذاری[5] است؛ در واقع وقتی کدون شروع تعیین شد، سه‌حرفی‌های متوالی به عنوان کدون خوانده می‌شوند. لذا در صورتی

1. Missense mutations   2. Nonsense mutations   3. Silent or synonymous mutations   4. Frameshift
5. Punctuation

ارتباط بالینی ۸-۴

آنالوگ‌های بازی تیوپورین به‌عنوان دارو

۶-مرکاپتو پورین (6-MP) یک آنالوگ پورینی خوراکی است که در شیمی درمانی لوسمی‌های حاد و برای سرکوب‌ایمنی بعد از پیوند عضو مفید می‌باشد. این دارو با چند مکانیسم عمل می‌کند که شامل مهار بیوسنتز پورین و اثرات سمّی بعد از قرارگیری در داخل DNA می‌باشند. 6-MP به مشتق ریبوزید ´۵-فسفات متابولیزه می‌شود که به‌دلیل تجزیه توسط گزانتین اکسیداز، نیمه-عمر کوتاهی دارد. در بیمارانی که برای هیپراوریسمی همراه با نقرس تحت درمان با آلوپورینول (یک مهارکننده گزانتین اکسیداز) قرار دارند، این سرعت به‌میزان زیادی کاهش می‌یابد و به‌همین دلیل لازم است دوز مصرفی در این بیماران به میزان قابل توجهی کاهش داده شود.

آنزیم دیگری که 6-MP (و متابولیت مرتبط ۶-تیوگوانین) را متابولیزه می‌کند، تیوپورین متیل ترانسفراز (TPMT) می‌باشد. برخی بیماران (حدود ۱۰٪ جمعیت) از نظر چندشکلی که این آنزیم را غیرفعال می‌سازد، هتروزیگوس هستند و به‌همین دلیل ۵۰٪ فعالیت مورد نظر را دارند؛ یک به ۳۰۰ مردم نیز فاقد فعالیت TPMT هستند و در صورت درمان با 6-MP، خطر فوق‌العاده بالایی برای سرکوب ایمنی شدید و مرگ دارند. برعکس، افرادی که این داروها را سریعاً متابولیزه می‌کنند، ممکن است دوز درمانی مناسبی را دریافت نکنند. لذا این تفاوت فارماکولوژیکی، مشکلات جدیدی را در خصوص درمان با تیوپورین‌ها به‌وجود می‌آورد.

جهش‌های نقطه‌ای

---CUGACGUAUUUUAAUGUCATG--- → ---CUGACGUCUUUUAAUGUCATG---
---LeuThrTyrPheAsnValMet--- → ---LeuThrSerPheAsnValMet---

(a) جهش بدمعنی (A به C)

---CUGACGUAUUUUAAUGUCATG--- → ---CUGACGUAAUUUAAUGUCATG---
---LeuThrTyrPheAsnValMet--- → ---LeuThr***stop

(b) جهش بدمعنی (A به U)

الحاق‌ها و حذف‌ها

---CUGACGUAUUUUAAUGUCATG--- → ---CUGAACGUCUUUUAAUGUCATG---
---LeuThrTyrPheAsnValMet--- → ---LeuAsnValPhe***stop

(C) الحاق (A) سبب تغییر قالب و یک جهش تغییر قالب می‌شود

---CUGACGUAUUUUAAUGUCATG--- → ---UGACGUCUUUUAAUGUCATG---
---LeuThrTyrPheAsnValMet--- → ---***stop

(d) حذف (اولین C) سبب تغییر قالب و یک جهش تغییر قالب می‌شود

---CGGCGG [CGG $]_{45}$ CGG--- → ---CGGCGG [CGG $]_{102}$ CGG---

(e) امتداد سه نوکلئوتیدی می‌تواند سبب بیماری شود

شکل ۲۴-۴ جهش‌ها. جهش‌های نقطه‌ای (a) یک جهش نقطه‌ای بدمعنی سبب تغییر یک اسید آمینه در پلی‌پپتید کدشده می‌شود. (b) یک جهش بی‌معنی سبب تغییر کدون یک اسید آمینه به یک کدون خاتمه می‌شود که سنتز پلی‌پپتید کدشونده را خاتمه می‌دهد. جهش‌های الحاقی/حذفی. (c) الحاق یک نوکلئوتید سبب تغییر قالب خواندن تمامی کدون‌ها بعد از نقطه الحاق می‌شود؛ این معمولاً منجر به تولید یک کدون خاتمه جدید می‌گردد که سنتز را خاتمه می‌دهد. (d) یک نوکلئوتید سبب تغییر قالب خواندن تمامی کدون‌ها بعد از نقطه حذف می‌شود؛ این معمولاً منجر به تولید یک کدون خاتمه جدید می‌گردد که سنتز را خاتمه می‌دهد. (e) امتداد سه‌نوکلئوتیدی، یک افزایش قابل توجه در تعداد تکرارهای سه‌نوکلئوتیدی است. امتداد سه‌نوکلئوتیدی، به‌واسطه افزودن قطعاتی از یک اسید آمینه به پلی‌پپتید کدشده یا از طریق ایجاد اختلال در تنظیم یک ژن، منجر به بیماری‌های مختلفی نظیر بیماری هانتینگتون و بیماری X شکننده می‌شود.

که افزودن (یا حذف) مضرب سه‌تایی جفت‌های بازی در یک ناحیه کدکننده سبب اضافه‌شدن (یا کسر) اسیدهای آمینه به (یا از) یک پروتئین می‌شود، افزودن سایر مقادیر جفت بازها همراه با تغییر قالب‌خواندن از آن نقطه به بعد می‌شود. وقتی در اثر تغییر قالب کدون‌های

ارتباط بالینی ۹-۴

پزشکی شخصی‌شده

به‌واسطه تجمع بسیار تدریجی جهش‌ها طی نسل‌های متمادی در جمعیت، افراد از نظر توالی DNA موجود در ژنوم خود، تفاوت‌های ظریفی با یکدیگر دارند. شایع‌ترین تفاوت‌ها در یک جفت باز دیده شده و چندشکلی تک-نوکلئوتیدی (SNP)[1] نامیده می‌شود (هرچند، چندشکلی تک-جفت بازی صحیح‌تر می‌باشد). حدود ۷ میلیون SNP تصدیق‌شده در ژنوم انسانی وجود دارد، و تعداد بسیار بیشتری گزارش شده است که به‌طور متوسط ۱ در ۵۰۰ می‌باشد. اکثر چندشکلی‌ها بر روی عملکرد سلول تأثیری ندارند، ولی مواردی منجر به تغییرات متعددی می‌شوند که آنها را می‌بینیم. برخی از آنها بر روی حساسیت به بیماری‌های اختصاصی اثر می‌گذارند و برخی نیز برای متابولیسم داروها و سایر ترکیبات (فارماکوکینتیک) تأثیر می‌گذارند، در حالی موارد دیگر بر روی پاسخ به این داروها مؤثر می‌باشند.

به‌عنوان بخشی از قسمت طرح ژنومی انسان، تلاشی زیادی برای یافتن و دسته‌بندی چندشکلی‌ها صورت گرفته است. هر چه اطلاعات ما در خصوص اثرات این تفاوت‌های توالی بر روی بیماری و درمان بیشتر می‌شود، پزشکی بیشتر مختص به فرد می‌گردد. امروزه فناوری‌هایی وجود دارند که سریعاً مشخص می‌کنند که کدام چندشکلی‌ها در محل‌های اختصاصی در ژنوم یک فرد وجود دارند. وقتی این فناوری‌ها ارزانتر و روتین‌تر (معمول‌تر) شوند، تعیین آلل موجود در ژن‌های کلیدی به بخش روتینی از تشخیص و طراحی درمان تبدیل می‌شود. برای مثال، تفاوت‌های قابل‌توجهی بین افراد در سرعت متابولیسم داروها وجود دارد (با ارتباط بالینی ۷-۴ مقایسه کنید). یک دوز استاندارد براساس وزن بدن ممکن است برای فردی که دارو را سریعاً متابولیزه می‌کند، بسیار کم تأثیر باشد، ولی ممکن است برای فردی که متابولیسم بسیار آهسته‌تری دارد، سمّی باشد. تعیین چندشکلی‌های مرتبط و آزمایش روتین می‌تواند منجر به درمان‌های مؤثرتر با عوارض جانبی کمتر گردد.

1. Single nucleotide polymorphism

توقف برداشت و یا افزوده می‌شوند، نتیجه معمولاً خاتمه نارس (یا به‌ندرت طویل‌سازی) یک زنجیر پلی‌پپتیدی کدشونده می‌باشد. برخی مواد شیمیایی، شامل **آکریدین‌ها** و **پروفلاوین**، در داخل DNA، در بین جفت بازهای مجاور، قرار می‌گیرند. این موضوع معمولاً منجر به الحاق یا حذف یک جفت باز و بنابراین یک تغییر قالب می‌شود. جهش‌ها همچنین ممکن است از تغییراتی در مقیاس بزرگ‌تر، شامل الحاق ترانس‌پوسون‌ها، حاصل شوند. با وجود این که جهش‌ها در هر نسلی نادر هستند، ولی طی میلیون‌ها سال در جمعیت‌ها تجمع یافته‌اند و به‌همین دلیل دو نفر به ازاء هر ۱۰۰۰ bp تقریباً ۱ bp در ژنوم خود با یکدیگر اختلاف دارند. بسیاری از این تفاوت‌های ژنتیکی بدون اثر هستند، ولی برخی از آنها بر روی فیزیولوژی، حساسیت به بیماری و پاسخ به درمان تأثیر می‌گذارند (ارتباط بالینی ۹-۴).

ژنوم حاوی قطعات متعددی از توالی‌های تکراری ۲، ۳، ۴ و ۵ نوکلئوتیدی است. این تکرارهای ساده یک میزان جهش بیش از حد متوسط را دارند، زیرا گاهی می‌توانند طی همانندسازی و نوترکیبی به شکل نامناسبی به صف درآیند. لذا طی نسل‌های متمادی، طول‌های متفاوتی از این توالی‌ها در جمعیت انسانی تجمع می‌یابند؛ اینها را چندشکلی‌های طول-توالی ساده[1] (یا ریزقمر[2] یا چندشکلی‌های تکرار-توالی ساده[3]) گویند. یک نوع اختصاصی جهش وجود دارد که از افزایش قابل توجه در تعداد سه‌حرفی‌های تکراری (برای

1. Simple sequence-length polymorphisms
2. Microsatellites
3. Simple sequence-repeat polymorphisms

مثال، CGGCGG[CGG]nCGG)، تحت عنوان **امتداد سه حرفی**[1] حاصل می‌شود (شکل ۲۴e-۴). وقتی طول یک تکرار سه‌حرفی از حد طبیعی تجاوز می‌کند، می‌تواند با کدنمودن یک قطعه بسیار بلندتر از حد طبیعی یک ریشه اسید آمینه یکسان در پلی‌پپتید کدشده، همانند بیماری هانتینگتون[2]، منجر به بیماری شود (ارتباط بالینی ۶-۲). همانند سندروم X شکننده[3]، امتداد سه‌حرفی همچنین می‌تواند بر روی تنظیم یک ژن تأثیر بگذارد (ارتباط بالینی ۶-۲) که در آن توالی سه حرفی که به میزان زیادی در پروموتر امتدادیافته است، بیان ژن را تغییر می‌دهد. یک پدیده غیرمعمول در مورد این بیماری‌های امتداد سه‌حرفی وجود دارد: به دلیل افزایش بعدی در طول سه حرفی، بیماری اغلب در نسل‌های بعدی بدتر می‌شود، زیرا هر چه توالی تکراری بلندتر باشد، احتمال بیشتری برای صف‌بندی نامناسب در طی همانندسازی وجود دارد و یا کراسینگ‌اُور نابرابر منجر به تکرارهای بسیار بلندتر می‌شود.

۴-۶ • ترمیم DNA

حفظ اطلاعات ژنتیکی نیاز به ترمیم ثابت آسیب DNA دارد. تمامی موجودات دارای زندگی آزاد چندین مکانیسم برای ترمیم آسیب DNA دارند. برخی ضایعات مستقیماً ترمیم می‌شوند، ولی بیشتر آنها به‌عنوان قسمتی از فرایند ترمیم از DNA برداشت می‌شوند که با استفاده از اطلاعات ژنتیکی مکمل موجود بر روی رشته دیگر، امکان برگرداندن توالی صحیح بر روی رشته آسیب‌دیده را فراهم می‌سازد.

ترمیم برداشتی

ترمیم برداشتی[4] یک مکانیسم عمومی است که می‌تواند به شکل بسیار صحیحی بسیاری از انواع آسیب‌ها را ترمیم کند. خصوصیت تعریف‌کننده ترمیم برداشتی، برداشت نوکلئوتید(های) آسیب‌دیده، ایجاد یک شکاف در DNA، به دنبال آن سنتز مجدد با استفاده از اطلاعات ژنتیکی موجود در رشته مخالف، و سپس دوختن برای ایجاد پیوستگی DNA می‌باشد. ترمیم برداشتی به دو طریق اصلی انجام می‌شود: **ترمیم برداشت بازی**[5] **(BER)** و **ترمیم برداشت نوکلئوتیدی**[6] **(NER)** (جدول ۴-۴).

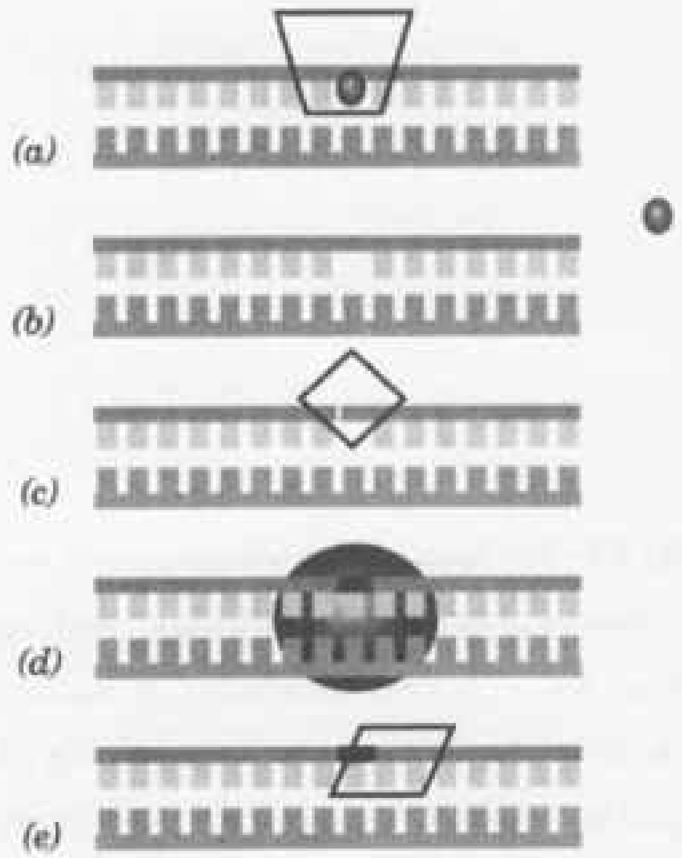
ترمیم برداشت بازی

ترمیم برداشت بازی یک فرایند ضروری است که بسیاری از انواع مختلف بازهای آسیب‌دیده، شامل بازهای متیله، بازهای دآمینه (برای مثال، U حاصل از دآمیناسیون C)، بازهای اکسیده و جایگاه‌های آبازی (AP)، را ترمیم می‌کند. مرحله ابتدایی، برداشت یک باز آسیب‌دیده از اسکلت DNA توسط یک **DNA گلیکوزیلاز** می‌باشد؛ این آنزیم پیوند N-گلیکوزیل

1. Triplet expansion
2. Huntington disease
3. Fragil X syndrome
4. Excision repair
5. Base excision repair
6. Nucleotide excision repair

جدول ۴-۴ • ترمیم برداشتی

مراحل پایه	
• شناسایی آسیب • برداشت آسیب با برداشت قسمتی از یک رشته و باقی‌گذاشتن یک شکاف • سنتز مجدد برای پرکردن شکاف؛ استفاده از اطلاعات موجود در رشته دیگر • دوخت برای ایجاد مجدد پیوستگی اسکلت DNA	
ترمیم برداشت بازی	**ترمیم برداشت نوکلئوتیدی**
• گلیکوزیلاز باز را برداشت کرده و اسکلت سالم را باقی می‌گذارد.	• برداشت دوبرشی آسیب به‌صورت یک قطعه اولیگونوکلئوتیدی (۱۳-۱۲ نوکلئوتید در *E.coli*، ۲۹-۲۷ نوکلئوتیدی در انسان)
• AP آندونوکلئاز اسکلت را می‌برد، AP لیاز قند را برمی‌دارد.	
• DNA پلیمراز شکاف را پر می‌کند	• DNA پلیمراز شکاف را پر می‌کند
• DNA لیگاز برش را می‌دوزد	• DNA لیگاز برش را می‌دوزد



شکل ۲۵-۴ ترمیم برداشت بازی. (a) محل آسیب دیده (نقطه بزرگ) توسط یک DNA گلیکوزیلاز مورد شناسایی قرار می‌گیرد. (b) این باز با تجزیه پیوند گلیکوزیلی که آن را به قند داکسی‌ریبوز متصل می‌کند، برداشت می‌شود؛ اسکلت قند - فسفات شکسته نمی‌شود. نتیجه باقی‌ماندن یک جایگاه AP است. (c) اسکلت قند - فسفات در سمت ′۵ جایگاه آبازی (فاقد باز) توسط یک AP آندونوکلئاز شکسته می‌شود. همچنین یک شکست در سمت ′۳ این جایگاه رخ می‌دهد که سبب برداشت ریشه قند می‌شود؛ این عمل ممکن است توسط برخی AP آندونوکلئازها و یا به‌واسطه یک فعالیت AP لیازی انجام شود. (d) شکاف تک نوکلئوتیدی توسط یک DNA پلیمراز پر می‌شود. (e) برش باقیمانده توسط یک DNA لیگاز دوخته می‌شود.

موجود در بین قند و باز را می‌شکنند (شکل ۲۵-۴). در این مرحله اسکلت قند-فسفات DNA شکسته نمی‌شود؛ در عوض یک داکسی ریبوز آبازی، یک جایگاه **AP**، در این اسکلت به‌وجود می‌آید. دو فعالیت متفاوت برای برداشت قند باقیمانده مورد نیاز است: یک **AP آندونوکلئاز** که پیوند فسفودی‌استری را در سمت ′۵ می‌شکند، ولی همچنان قند را به شکل متصل به نوکلئوتید بعدی باقی می‌گذارد، و یک **AP لیاز** که سمت ′۳ جایگاه AP را برش داده تا قند برداشت گردد. شکاف تک نوکلئوتیدی حاصل یک ′۳ - هیدروکسیل آزاد دارد. این شکاف توسط یک DNA پلیمراز پر شده و توسط یک DNA لیگاز دوخته می‌شود (شکل ۲۵-۴).

حداقل هشت گلیکوزیلاز مختلف در انسان وجود دارد که هر کدام نوع خاصی از باز آسیب‌دیده را شناسایی می‌کند. یکی از اینها، **اوراسیل DNA گلیکوزیلاز**[1] **(UNG)** می‌باشد که برای برداشت U از DNA اختصاصی است. U از اجزاء طبیعی DNA نمی‌باشد، بلکه در اثر دآمیناسیون C سیتوزین تولید شده و گاهی نیز در هنگام همانندسازی در داخل DNA قرار داده می‌شود. فراوانی دآمیناسیون C به U که قبلاً به آن اشاره شد (شکل ۲۳a-۴)، می‌تواند منجر به میزان بالای جهش شود؛ لذا پیدایش یک مکانیسم ترمیمی اختصاصی برای برداشت U، تعجب‌آور نمی‌باشد. ولی تعداد زیادی از ریشه‌های C موجود در DNA پستانداران، موجود در توالی CG، در موقعیت ۵ متیله می‌شوند؛ این تغییر در تنظیم بیان ژن مهم است. در اثر دآمیناسیون یک ۵-متیل C تولید یک T، به‌جای U، در DNA می‌شود. این ریشه‌های T توسط اوراسیل DNA گلیکوزیلاز شناسایی نمی‌شوند، ولی گلیکوزیلازهای دیگری وجود دارند که بدتطابق T:G را شناسایی نموده و ترجیحاً T را برداشت نموده و

1. Uracil DNA glycosylase

یک جایگاه AP باقی می‌گذارد (شکل b ۲۳-۴). هرچند، گاهی سیستم ترمیمی بدتطابق، G را به‌جای T برداشت نموده و یک جهش تولید می‌کند. طی میلیون‌ها سال این تغییر سبب شده تا فراوانی دی‌نوکلئوتیدهای CG در DNA پستانداران بسیار کمتر از میزان مورد انتظار باشد.

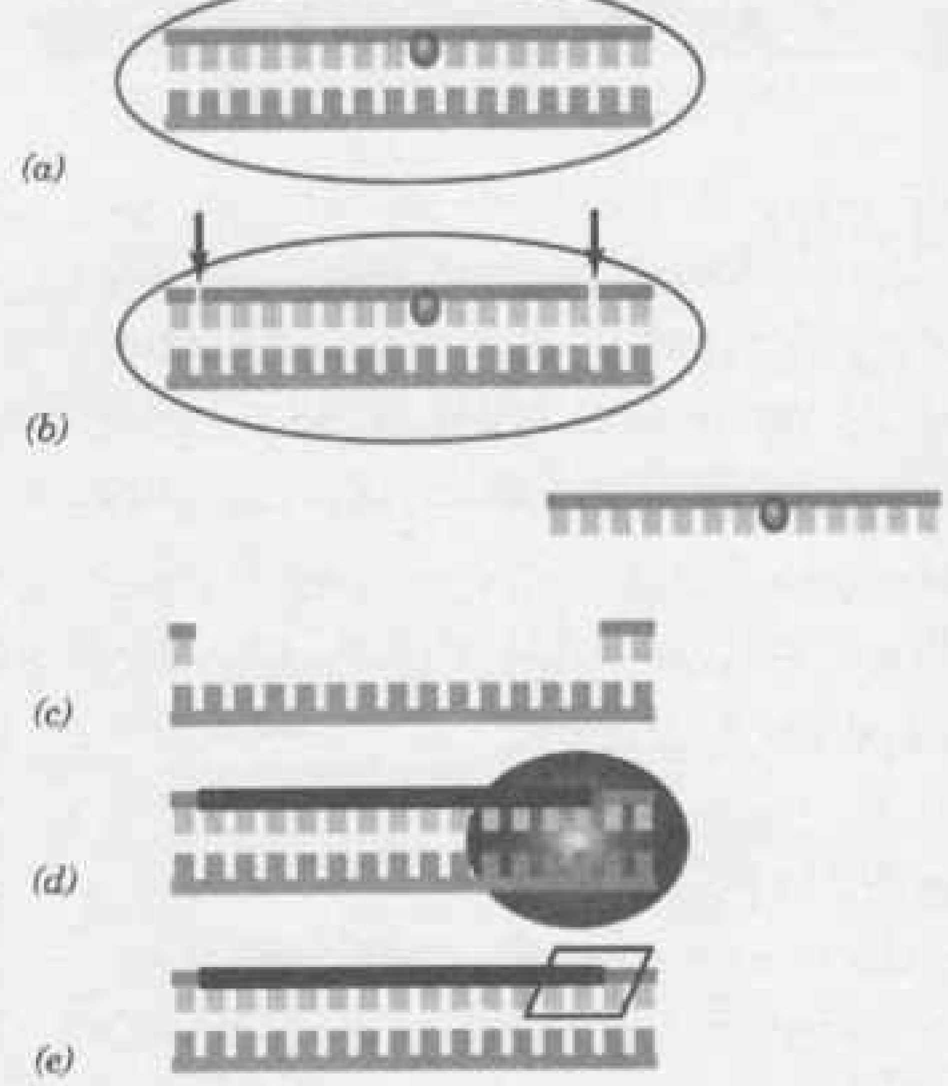
۸-اکسو گوانین (شکل c۲۳-۴) ضایعه معمول دیگری است که در اثر دآمیناسیون اکسیداتیو تولید شده و منجر به ترانس‌ورشن می‌شود. یک مسیر ترمیمی اختصاصی وجود دارد که برای ترمیم ۸-اکسو گوانین طراحی شده است؛ OGG1 ضایعه را از DNA برداشت می‌کند. در صورتی‌که همانندسازی رخ داده باشد، MUTYH ریشه Aای را برداشت می‌کند که ممکن است به شکل نامناسبی در مقابل ۸-اکسو گوانین قرار گرفته باشد و شرایط را برای قراردادن C صحیح توسط پلیمراز ترمیمی فراهم می‌سازد.

APE1 مهمترین **AP آندونوکلئاز** در انسان است. بعد از شکستن سمت ′۵ جایگاه AP برای ایجاد یک OH-′۳ آزاد، APE1 آنزیم DNA پلیمراز β(polβ) را به این جایگاه فرا می‌خواند. polβ یک فعالیت **AP لیازی** دارد که قند فسفات آبازی باقیمانده را از محل شکست رشته برداشت نموده و یک شکاف تک-نوکلئوتیدی را با یک OH-′۳ آزاد باقی می‌گذارد. polβ همچنین فعالیت DNA پلیمرازی دارد که می‌تواند این شکاف را پر کند. در مورد بسیاری از انواع آسیب‌ها، این شکاف تنها با یک یا دو نوکلئوتید پر می‌شود؛ این را **ترمیم تکه‌ای کوتاه**[1] گویند. در مواردی که AP لیاز به راحتی نمی‌تواند قند فسفات را برداشت کند، جایگزینی رشته می‌تواند آویخته‌ای از چند نوکلئوتید را تولید کند و آندونوکلئاز FEN1 (که قبلاً اشاره شد به برداشت RNA از قطعات اوکازاکی نیز کمک می‌کند) می‌تواند آن را جدا کند. شکافی که قدری بزرگتر باشد توسط پلیمرازی نظیر polβ، یا احتمالاً pol δ (یا pol ε) تحریک‌شده با PCNA، پر می‌شود. در هر صورت، برش باقیمانده توسط یک DNA لیگاز دوخته می‌شود. این فرایند به‌واسطه تعاملات پروتئین-پروتئین هماهنگ می‌شود که قبل از فراخوانی آنزیم بعدی به این محل، برش و ترکیبات را حفاظت می‌کنند.

ترمیم برداشت نوکلئوتیدی

ترمیم برداشت نوکلئوتیدی بر روی انواع وسیعی از آسیب‌ها عمل می‌کند که به‌طور شاخص شامل اداکت‌های بزرگ یا تغییر شکل ساختمان مارپیچی دورشته DNA می‌باشند. بیشترین مطالعات بر روی دیمرهای پیریمیدینی انجام شده است که محصولات اصلی آسیب حاصل از اشعه ماوراءبنفش هستند (شکل d۲۳-۴ و e). اداکت‌های شیمیایی یا مواد سرطانزایی نظیر **بنزو(a) پیرن** و **آفلاتوکسین** و همچنین عوامل شیمی‌درمانی نظیر **سیس‌پلاتین**، به همراه برخی از بازهای بدتطابق و قوس‌های کوچک موجود در DNA، از طریق این مسیر برداشت می‌شوند. آسیب مورد نظر توسط کمپلکس آنزیمی برداشت می‌شود که در محل‌هایی به فاصله

1. Short patch repair



شکل ۲۶-۴ ترمیم برداشت نوکلئوتیدی. (a) باز آسیب دیده (نقطه بزرگ) توسط یک کمپلکس ترمیمی DNA مورد شناسایی قرار می‌گیرد. (b) قطعه اطراف باز آسیب‌دیده توسط یک کمپلکس آنزیمی برداشت می‌شود که دو برش در رشته آسیب‌دیده، یکی در هر سمت آن، به‌وجود می‌آورد. (c) یک اولیگونوکلئوتید (۲۹-۲۷ نوکلئوتیدی در انسان، ۱۳-۱۲ نوکلئوتیدی در *E.coli*) آزاد می‌شود. (d) سنتز مجدد: یک DNA پلیمراز شکاف را با استفاده از رشته مخالف به‌عنوان الگو پر می‌کند. DNA (e) لیگاز برش باقیمانده را می‌دوزد.

چند نوکلئوتید در طرفین باز(های) آسیب‌دیده ایجاد برش می‌کند، به طوری که این آسیب به‌صورت قسمتی از یک اولیگونوکلئوتید برداشت می‌گردد (شکل ۲۶-۴).

در *E.coli* آسیب توسط یک کمپلکس برداشت آسیب متشکل از Uvr A، Uvr B و Uvr C شناسایی و دو برش آندونوکلئولیتیک، یکی به فاصله ۳ تا ۵ نوکلئوتید در سمت ′۳ ضایعه و دیگری به فاصله ۸ نوکلئوتید در سمت ′۵ آن ایجاد می‌شود. بدین‌ترتیب ضایعه به‌عنوان قسمتی از یک اولیگونوکلئوتید با ۱۳-۱۲ نوکلئوتید برداشت می‌شود. به‌نظر می‌رسد فرایند با شناسایی آسیب توسط UvrA آغاز شده و برای بازنمودن رشته‌ها توسط Uvr B (یک هلیکاز) نیاز به انرژی حاصل از هیدرولیز می‌باشد. Uvr C اتصال یافته و دو برش، یکی در هر طرف آسیب، ایجاد می‌کند. این شکاف توسط یک DNA پلیمراز پر شده و به‌دنبال آن محل برش گره زده می‌شود.

در پستانداران، چندین کمپلکس آنزیمی بزرگ در شناسایی آسیب، بازنمودن DNA و ایجاد دو برش نقش دارند. بیماری اتوزومال مغلوب نادر **گزرودرما پیگمنتوزوم**[1] که مبتلایان را حساس به نور و سرطان پوست می‌کند، نتیجه جهش در یکی از هفت ژن درگیر در ترمیم برداشتی یا یک ژن درگیر در سنتز DNA با عبور از ضایعه[2] می‌باشد (ارتباط بالینی ۱۰-۴). XPC قسمتی از کمپلکسی است که اتصال محکم با ضایعاتی برقرار می‌کند که سبب تغییر شکل ساختمان DNA می‌شوند. XPA یک فاکتور کلیدی است که در شناسایی آسیب و همایش کمپلکس برداشتی نقش دارد؛ جهش در ژن XPA منجر به ناتوانی اساسی افراد در

1. Xeroderma pigmentosum 2. Translesion DNA synthesis

ارتباط بالینی ۱۰-۴

گزرودرما پیگمنتوزوم

گزرودرما پیگمنتوزوم (XP) (OMIM۱۹۴۴۰۰) اولین بیماری است که نشان داده شد به‌دلیل نقص در ترمیم DNA به‌وجود می‌آید. مبتلایان حساسیت به نور و حساسیت شدید به سرطان پوست را در نواحی از بدن دارند که در تماس با نور خورشید می‌باشد؛ میزان سرطان پوست ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ برابر حالت متوسط می‌باشد. بسیاری از بیماران مشکلات عصبی نیز دارند.

XP یک بیماری اتوزومال مغلوب نادر است که می‌تواند به دلیل وجود نقص‌هایی در هشت ژن مختلف، هر کدام به تنهایی، باشد که انعکاسی از پیچیدگی ترمیم دیمرهای پیریمیدینی است که شایع‌ترین آسیب ناشی از تماس با نور ماوراء بنفش می‌باشد. جهش در هفت ژن XP منجر به نقص‌هایی در مرحله ابتدایی ایجاد برش در ترمیم برداشت نوکلئوتیدی دیمرهای پیریمیدینی می‌شود. این موضوع، حساسیت نوری فوق‌العاده را به عنوان یک مشخصه این بیماری توجیه می‌کند. کلاس دیگری که XP-V (V برای واریانت) نامیده می‌شود، فاقد نقص قابل جستجو در ترمیم برداشتی است، ولی نقصی در سنتز عبور از ضایعه بعد از آسیب UV دارد. سلول‌های مربوط به افراد مبتلا به XP همچنین ممکن است حساسیت زیادی به مواد سرطانزای حاصل از استعمال دخانیات داشته باشند.

XP-C در اتصال ابتدایی به آسیب در نواحی نقش دارد که رونویسی نمی‌شوند و TFII-H را به عنوان یک فاکتور رونویسی فرا می‌خوانند. در نواحی رونویسی‌شونده، RNA پلیمراز متوقف‌شده آسیب را شناسایی نموده و TFII-H را فرا می‌خواند. XPB و XPD پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که به‌عنوان زیرواحدهای TFII-H هستند. TFII-H می‌تواند به‌عنوان یک هلیکاز عمل نموده و ناحیه‌ای را در اطراف دیمر باز کند. XPA برای شناسایی دیمرهای پیریمیدینی ضروری بوده و با سایر پروتئین‌های ترمیمی تعامل می‌کند. ERCC1-XPF کمپلکسی است که به TFII-H اتصال یافته و در سمت ′۵ دیمر ایجاد برش می‌کند. XPG این برش را در سمت ′۳ به‌وجود می‌آورد.

قابل ذکر است که نقص در XP-B، XP-D یا XP-G همچنین می‌تواند منجر به سندروم کوکین شود که همراه با حساسیت نوری، نقص در رشد، و کمبود ذهنی باشد. نقص در XP-B یا XP-D همچنین منجر به تری‌کوتیو-دیستروفی[1] با علائمی شامل حساسیت به نور، قامت کوتاه، و اختلالات هوشی می‌شود. لذا تغییرات متفاوت در ژن‌های یکسان، احتمالاً از طریق ایجاد اثرات متفاوت بر عملکردهای ترمیمی و رونویسی این پروتئین‌ها، می‌توانند منجر به سندروم‌های متفاوتی شوند.

1. Trichothiodystrophy

برداشت دیمرهای پیریمیدینی می‌گردد که در اثر UV به‌وجود آمده‌اند. **XPA** کمپلکس بزرگی تحت عنوان **TFII-H** را فرا می‌خواند که یک فاکتور رونویسی عمومی است و در شروع رونویسی نقش دارد. **TFII-H** حاوی زیرواحدهای **XPB** و **XPD** است که هر دو **ATPase**هایی با فعالیت هلیکازی محدود هستند. **DNA** با فعالیت هلیکازی **TFII-H** به‌طور نسبی باز شده و تولید حبابی در حدود ۲۵ جفت باز می‌کند. سپس یک هترودیمر تکمیل-عرضی ترمیم برداشتی ۱[1] (**XPF/ERCC1**) یک برش آندونوکلئولیتیکی را در رشته آسیب‌دیده به فاصله حدود ۲۴-۲۲ نوکلئوتید در سمت ′۵ ضایعه ایجاد می‌کند و **XPG** نیز یک برش آندونوکلئولیتیکی را به فاصله حدود ۵ نوکلئوتید در سمت ′۳ ضایعه به‌وجود می‌آورد. در نتیجه این دو برش، اولیگونوکلئوتیدی به طول حدود ۲۷ تا ۲۹ نوکلئوتید حاصل می‌شود که حاوی ضایعه است. برای ترمیم برداشتی نیاز به پروتئین اتصال به **DNA** تک-رشته **RPA** می‌باشد. **RPA** به شکاف موجود در **DNA** اتصال یافته و این شکاف

1. Excision repair cross-complementing 1

به‌واسطه PCNA توسط $pol\delta$ (یا $pol\varepsilon$) پر می‌شود. برش باقیمانده توسط یک DNA لیگاز، احتمالاً LIG1، دوخته می‌شود. مراحل انتهایی مشابه تکمیل یک قطعه اوکازاکی هستند.

ترمیم جفت‌شده با رونویسی

بسیاری از ضایعات به همان طریقی که مانع همانندسازی می‌شوند، از رونویسی نیز جلوگیری می‌کنند. لذا سلول‌ها حتی در زمانی که DNA را سنتز نمی‌کنند ممکن است با یک مشکل اساسی مواجه شوند: آنها برای بقاء می‌بایست بتوانند پروتئین‌های کلیدی را سنتز کنند. **ترمیم جفت‌شده با رونویسی**[1] پاسخ ترمیمی فوری را به رشته الگو در نواحی رونویسی‌شونده هدایت می‌کند، به‌طوری که ضایعات این نواحی سریع‌تر از ضایعات موجود در هر محل دیگر ترمیم شده و به‌دنبال آن رونویسی می‌تواند از سر گرفته شود؛ ارزش این موضوع برای ادامه حیات آشکار می‌باشد. ترمیم جفت‌شده با رونویسی شکلی از ترمیم برداشتی است که توسط یک کمپلکس RNA پلیمراز متوقف‌شده در محل یک ضایعه آغاز می‌گردد. در سلول‌های اوکاریوتی، کمپلکسی حاوی CSA و CSB (جهش‌هایی که سبب سندروم کوکین[2]، بیماری دیگر حاصل از نقص در ترمیم DNA) RNA پلیمراز متوقف‌شده را شناسایی نموده و سبب برگشت به عقب آن از محل ضایعه به همراه فراخوانی پروتئین‌های ترمیمی نظیر TFII-H می‌شود. سپس انواع متعددی از آسیب‌هایی که مانع رونویسی شده‌اند، به طریق ترمیم برداشت نوکلئوتیدی با همکاری XPA، TFII-H و سایر فاکتورهای ترمیم برداشتی ترمیم می‌شوند. شواهد اخیر نشان می‌دهند که ترمیم جفت‌شده با رونویسی همچنین بر روی ضایعات اکسیداتیو عمل می‌کنند که بعد از برگشت به عقب کمپلکس رونویسی از محل ضایعه، ترمیم می‌گردند. بعد از تکمیل ترمیم، رونویسی از سر گرفته می‌شود.

ترمیم بدتطابق

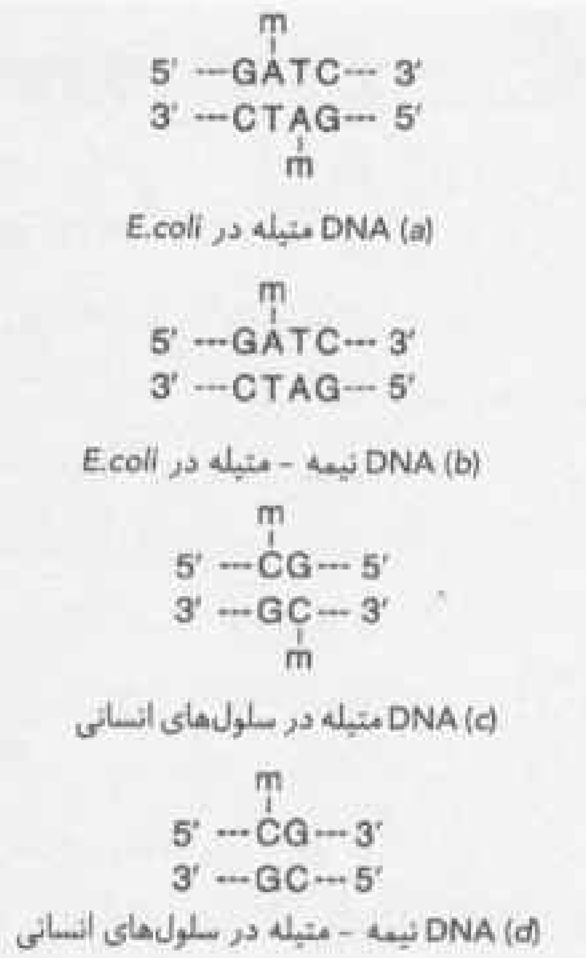
ترمیم بدتطابق شکل تخصص‌یافته‌ای از ترمیم برداشت نوکلئوتیدی است که خطاهای همانندسازی را برداشت می‌کند. بدتطابق‌ها، همانند آسیب DNA نیستند. آسیب یا باز تغییریافته‌ای وجود ندارد، و تنها یکی از چهار باز به غلط وجود دارد. لذا شناسایی بدتطابق‌ها متکی بر تغییرشکل ساختمان مارپیچ دورشته است. یکی از تفاوت‌های اصلی بین ترمیم آسیب DNA و ترمیم بدتطابق‌ها، انتخاب بازی است که برداشت می‌شود. آنزیم‌ها می‌توانند بازهای آسیب‌دیده را به‌طور اختصاصی شناسایی نموده و آنها را به صورت مجزا طی مسیر ترمیم برداشت بازی یا به عنوان قسمتی از یک اولیگونوکلئوتید در مسیر ترمیم برداشت نوکلئوتیدی، برداشت کنند. ولی وقتی یک بدتطابق مورد شناسایی قرار می‌گیرد، هر دو باز طبیعی هستند؛ کدام باز باید برداشت شود؟ برداشت باز تازه‌سنتز در رشته DNAای که تازه سنتز شده است، منجر به حفظ اطلاعات ژنتیکی می‌شود، در حالی که برداشت باز موجود

1. Transcription-coupled repair 2. Cockayne syndrome

در رشته مادری منجر به یک تغییر دائمی در DNA و ایجاد یک جهش می‌شود. انتخاب تصادفی منجر به ایجاد جهش در نیمی از موارد می‌شود که به شکل غیرقابل قبولی بالا است. لذا چالش در شناسایی رشته تازه‌سنتز و برداشت باز بدتطابق از آن رشته می‌باشد.

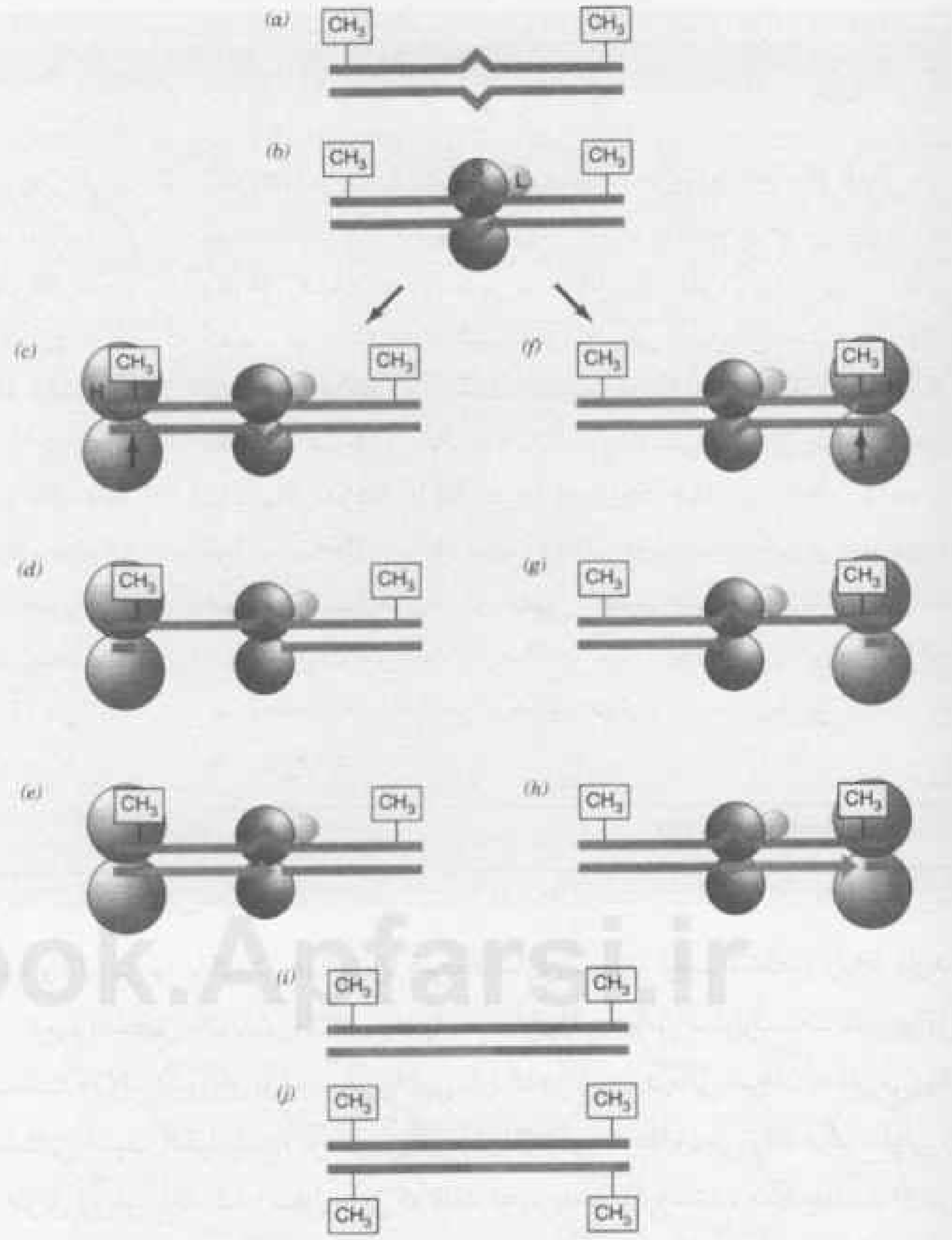
بهترین شناخت از سیستم ترمیم بدتطابق در *E.coli* وجود دارد. DNA موجود در اکثر موجودات (ولی نه تمامی آنها) در موقعیت‌های اختصاصی متیله می‌شوند. در *E.coli*، متیلاسیون بیشتر بر روی A در توالی GATC انجام می‌شود (شکل ۲۷a-۴) که یک توالی پالیندروم است (یعنی رشته مخالف در جهت ′۵ به ′۳ همان توالی را دارد)؛ هر دو رشته متیله هستند. این متیلاسیون اختصاصی تأثیری بر ایجاد جفت باز ندارد. ریشه‌های A به شکل تغییریافته در داخل DNA قرار داده می‌شوند و بعداً توسط یک متیلاز حمایتی[1] متیله می‌شوند که **توالی‌های نیمه‌متیله**[2] موجود در DNA (توالی‌های متیله تنها بر روی یک رشته، رشته مادری؛ شکل ۲۷b-۴) را شناسایی نموده و باز مناسب را متیله می‌کند. طی دوره زمانی بسیار کوتاهی که هنوز رشته دختر متیله نشده است، سیستم ترمیم بدتطابق *E.coli* می‌تواند رشته تازه‌سنتز را در ناحیه‌ای از یک بدتطابق شناسایی نموده و نوکلئوتید بدتطابق را از رشته جدید برداشت کند. بدتطابق‌ها توسط هُمودیمر MutS شناسایی می‌شوند که یک قوس حاوی بدتطابق را به‌وجود می‌آورند (شکل ۲۸-۴). یک هُمودیمر MutL اتصال یافته و شکست و برداشت بعدی را هماهنگ می‌کند. MutH رشته غیرمتیله تازه سنتز را در یک سمت بدتطابق برش می‌دهد. یک هلیکاز (UvrD) رشته را از محل برش تا محل بدتطابق باز نموده و برحسب موقعیت انتهای آزاد، تک رشته برش‌داده‌شده توسط یک ′۵ به ′۳ اگزونوکلئاز یا ′۳ به ′۵ اگزونوکلئاز تخریب می‌شود. شکاف بلندی (به طول صدها نوکلئوتید) ایجاد می‌شود که با فعالیت DNA و افزودن نوکلئوتیدها به انتهای ′۳ رشته برش داده شده، پر می‌گردد. بعد از پرنمودن شکاف، برش باقیمانده توسط DNA لیگاز دوخته می‌شود.

انسان سیستم ترمیم بدتطابق مشابهی با پروتئین‌های هُمولوگوس دارد، هرچند این سیستم پیچیده‌تر است و مکانیسم شناسایی رشته جدید نامشخص می‌باشد. DNA انسانی در موقعیت ۵ سیتوزین در توالی‌های CG متیله می‌شود (شکل ۲۷c-۴)، ولی مشخص نیست که آیا توالی‌های نیمه‌متیله CG، شکست‌های تک-رشته موقتی در محل قطعات اوکازاکی که به یکدیگر دوخته نشده‌اند، یا اتصال به PCNA، به شناسایی رشته تازه سنتز کمک می‌کند. چندین هُمولوگ MutS (پروتئین‌های MSH) و چندین هُمولوگ MutL (پروتئین‌های MLH و پروتئین‌های PMS) وجود دارند که به‌صورت هترودیمر عمل می‌کنند. $MutS\alpha$ که هترودیمری از MSH2 و MSH6 است، بدتطابق‌های باز-باز و الحاق‌ها/حذف‌های کوتاه را شناسایی می‌کند؛ $MutS\beta$ که هترودیمری از MSH2 و MSH3 است، الحاق‌ها/حذف‌های کوتاه را شناسایی می‌کند. $MutL\alpha$، دیمرهای حاوی MLH1 و PMS2، کمپلکس‌های اصلی مورد نیاز برای مرحله ایجاد برش هستند. آنزیم‌های مسئول برداشت



شکل ۲۷-۴ DNA متیله. (a) متیلاسیون DNA در *E.coli* بر روی A در داخل توالی GATC انجام می‌شود. (b) DNA نیمه‌متیله *E.coli*. DNA مادری متیله است، در حالی‌که DNA دختر هنوز متیله نشده است. (c) متیلاسیون در سلول‌های انسانی بر روی C در توالی CG انجام می‌شود. (d) DNA انسانی نیمه‌متیله. رشته DNA دختر هنوز متیله نشده است. توجه داشته باشید که در هر دو حالت، توالی‌ها پالیندروم هستند که در طول هر دو رشته (در جهت ′۵ به ′۳) یکسان خوانده می‌شوند، و ریشه‌های موجود در هر دو رشته نهایتاً متیله می‌گردند.

1. Maintenance methylase 2. Hemimethylated



شکل ۲۸-۴ ترمیم بدتطابق در *E.coli*. (a) یک بدتطابق در رشته DNAای که تازه همانندسازی شده است. رشته مادری متیله است، ولی رشته‌ای که تازه سنتز شده است، برای چند دقیقه بعد از سنتز، هنوز متیله نشده است؛ چنین جایگاهی با تنها یک رشته متیله را نیمه‌متیله گویند. (b) MutS و MutL به بدتطابق اتصال می‌یابند. وقتی این پروتئین‌ها یک قوس کوتاه از DNA را بیرون می‌کشند، ATP هیدرولیز می‌گردد. (c و f) MutH به یک جایگاه نیمه‌متیله متصل می‌شود (که می‌تواند در سمت راست یا چپ بدتطابق باشد). (d و g) رشته غیرمتیله برش داده شده و سپس برداشت می‌شود، به‌طوری که با حرکت رو به عقب بدتطابق را برمی‌دارد. این عمل ممکن است در هر جهتی انجام شود (d یا g). (e یا h) شکاف بلند حاصل با افزودن نوکلئوتیدها به انتهای ′۳ رشته، توسط یک DNA پلیمراز پر می‌شود. (i) برش باقیمانده توسط یک DNA لیگاز دوخته می‌شود. (j) جایگاه‌های نیمه‌متیله متیله می‌شوند.

رشته بریده‌شده در نقطه‌ای بعد از بدتطابق، شناخته نشده‌اند. همانند *E.coli* طول ناحیه برداشت شده، صدها نوکلئوتید می‌باشد. PCNA به‌عنوان گیره لغزشی، برای ترمیم بدتطابق لازم است. علاوه بر تنها نقش آن به‌عنوان یک فاکتور پیشروندگی برای DNA پلیمراز، به نظر می‌رسد این پروتئین در مرحله برداشت نیز فعالیت دارد. سنتز مجدد شکاف بزرگ حاصل به کمک DNA polδ (یا polε) و PCNA انجام می‌شود. برش باقیمانده توسط DNA لیگاز دوخته می‌شود.

نقص در ترمیم بدتطابق انسان منجر به **سرطان کولون غیرپولیپی ارثی**[1] **(HNPCC)** می‌شود (ارتباط بالینی ۱۱-۴). بین ۶۰٪ تا ۷۰٪ موارد HNPCC ناشی از جهش‌هایی در MLH1 یا MSH2 هستند و موارد دیگر حاصل جهش در سایر ژن‌های ترمیم بدتطابق می‌باشند. به نظر می‌رسد برخی سرطان‌های تک‌گیر، به‌خصوص کارسینوم‌های کولورکتال،

1. Hereditary nonpoliposis colon cancer

ارتباط بالینی ۱۱-۴

ترمیم بدتطابق و سرطان

نقص‌های مربوط به ترمیم بدتطابق منجر به سرطان غیرپولیپی ارثی کولون (HNPCC) شده و در چندین سرطان دیگر مهم می‌باشند. این موضوع در ابتدا با این یافته مطرح شد که برخی تومورهای کولون جهش‌های مکرر در ریزقمرها (چندشکلی‌های طول- توالی کوتاه، توالی‌های تکراری کوتاه، به‌خصوص منو و دی‌نوکلئوتیدها) را نشان دادند، فنوتیپی که ناپایداری و ریزقمری[1] نامیده شد.

HNPCC یک بیماری اتوزومال غالب است. ژن مربوط به خطر HNPCC به ناحیه‌ای نقشه‌برداری شد که حاوی یک ژن ترمیم بدتطابق می‌باشد. این موضوع سبب انجام مطالعاتی شد که نشان دادند نقص اصلی، جهشی در یکی از ژن‌های ترمیم بدتطابق می‌باشد. مشخص شده است که نقص در سایر ژن‌های بدتطابق نیز منجر به HNPCC می‌شوند؛ شایع‌ترین آنها شامل MLH1 و MSH2 می‌باشند.

چرا وراثت یک آلل دچار نقص در یک ژن ترمیم بدتطابق منجر به HNPCC می‌شود؟ سلول‌های پوشاننده مجرای روده به شکل فعالی در سرتاسر عمر فرد تقسیم می‌شوند. احتمال ایجاد یک جهش پیکری در یک آلل یک ژن ترمیم بدتطابق در حداقل یک سلول کولون، طی عمر یک فرد بالا می‌باشد. سلول‌هایی که در آنها یکی از این آلل‌ها در هر کدام از این لوکوس‌ها غیرفعال است، همچنان می‌تواند ترمیم بدتطابق را انجام دهد، لذا عموماً این موضوع منجر به تومور نمی‌شود. هر چند در فردی که یک آلل غیرفعال را به ارث برده است، یک جهش پیکری که تک‌نسخه فعال را غیرفعال می‌کند، منجر به نقص در ترمیم بدتطابق می‌شود میزان جهش در سلول‌های دارای ترمیم بدتطابق غیرفعال، می‌تواند ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر افزایش یابد. این موضوع سبب تجمع جهش‌هایی می‌شود که نهایتاً منجر به تولید تومور از طریق جهش‌هایی در ژن‌های تنظیم‌کننده رشد می‌گردند.

1. Microsatellite instability

معده و آندومتر نیز با کاهش فعالیت یا غیرفعال‌سازی سیستم ترمیم بدتطابق ارتباط دارند.

ترمیم بدتطابق یک نقش متناقض در پاسخ سلول‌ها به عوامل سیتوتوکسیک نظیر عوامل متیله‌کننده (*N*- نیتروزواوره[1]) و سیس‌پلاتین دارد که در شیمی‌درمانی سرطان به‌کار می‌رود. شناسایی آسیب آلکیله‌کننده توسط پروتئین‌های ترمیمی بدتطابق می‌تواند مرگ سلولی را به طریق آپوپتوز آغاز کند؛ سلول‌هایی که فاقد ترمیم بدتطابق هستند، ممکن است از این فرایند فرار نموده و به موجب آن نسبت به عوامل شیمی‌درمانی مقاوم شوند. احتمال جهش سلول‌هایی که دچار نقص ترمیم بدتطابق هستند، بیشتر می‌باشد که این موضوع می‌تواند سبب پیدایش تومورهایی شود که مهاجم‌تر هستند.

دمتیلاسیون مستقیم

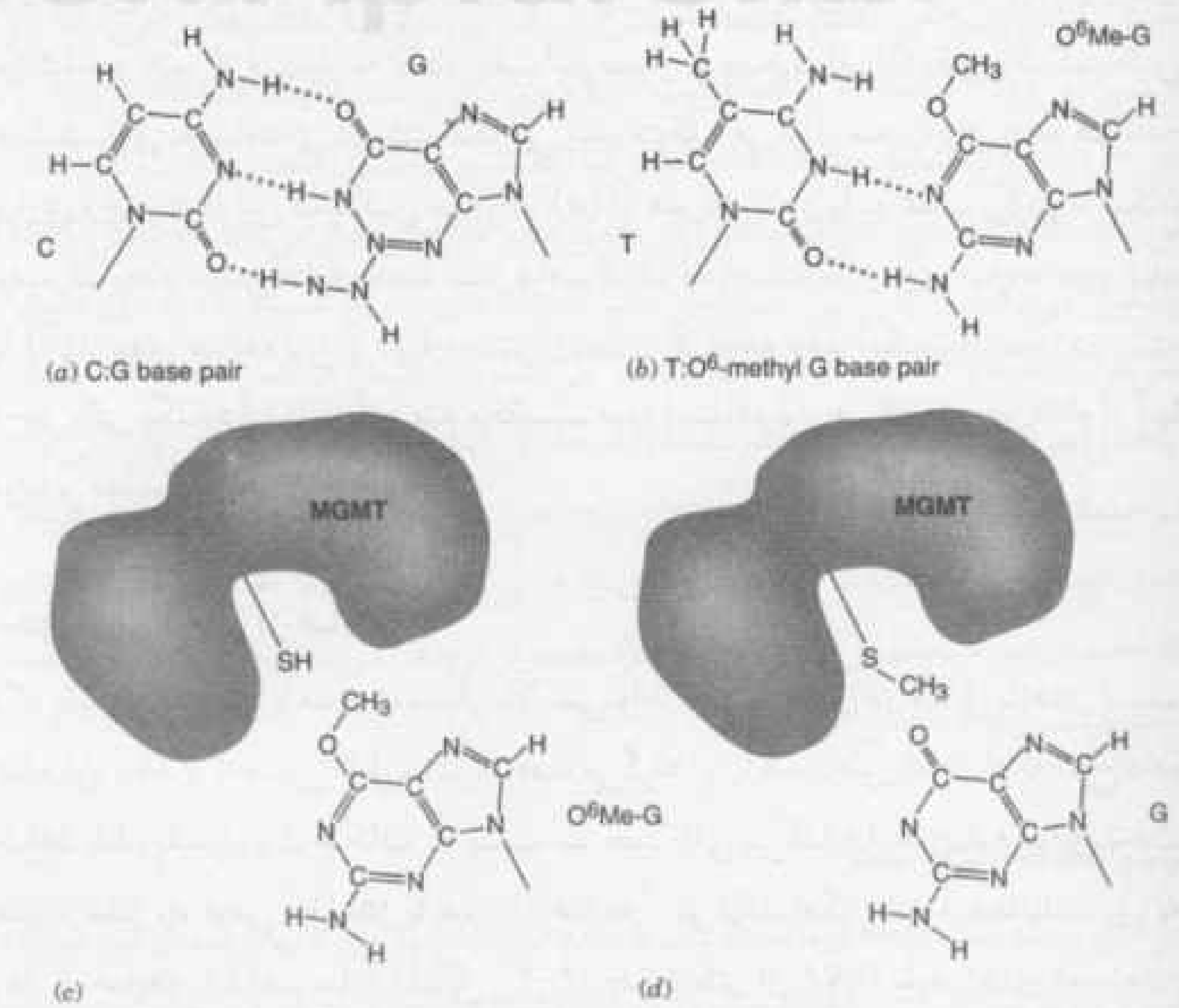
علاوه بر بازهایی که به‌طور طبیعی در داخل DNA متیله هستند، برخی بازها توسط مواد سرطانزا یا از طریق تعامل با حاملین طبیعی متیل در سلول‌ها (برای مثال، *S*-آدنوزیل متیونین)، به شکل نامناسبی آلکیله می‌شوند. آلکیلاسیون در موقعیت‌هایی که بر روی ایجاد جفت باز تأثیر می‌گذارد، شدیداً جهش‌زا می‌باشد. برای مثال، O^6- متیل گوانین به‌جای C، با T جفت می‌شود (شکل ۲۹a-۴)، لذا همانندسازی آن منجر به ایجاد جهش خواهد شد. سلول‌ها گلیکوزیلازهایی دارند که بازهای دارای متیلاسیون نامناسب را شناسایی نموده و

1. *N*-nitrosourea

ترمیم برداشت بازی را آغاز می‌کنند، ولی پروتئین‌های اختصاصی نیز وجود دارند که O^6–متیل گوانین را در DNA شناسایی نموده و مستقیماً گروه متیل را برداشت می‌کنند تا DNA سالم باقی بماند. **O^6 –متیل گوانین متیل‌ترانسفراز**[1] **(MGMT)** O^6–متیل گوانین را شناسایی نموده و گروه متیل را از گوانین به یک سیستئین بر روی پروتئین خود انتقال می‌دهد (شکل ۲۹b-۴). یک ملکول واحد MGMT می‌تواند تنها یک گروه متیل را برداشت کند، زیرا این متیلاسیون سبب غیرفعال‌سازی سیستئین پروتئین شده و آن را برای تخریب از طریق مسیر پروتئولیتیک اوبی‌کوئیتین هدفمند می‌سازد. هزینه برداشت یک گروه متیل از طریق این مسیر بالا است، زیرا سلول می‌بایست ژن این آنزیم را همانندسازی و رونویسی نموده و سپس mRNA مربوطه را پردازش و ترجمه کند که همه این مراحل نیاز به میزان قابل توجهی انرژی و مواد دارد. این موضوع دوباره تأکیدی بر اهمیت حفظ سلامت ژنوم، حتی به قیمت هزینه متابولیکی زیاد، می‌باشد.

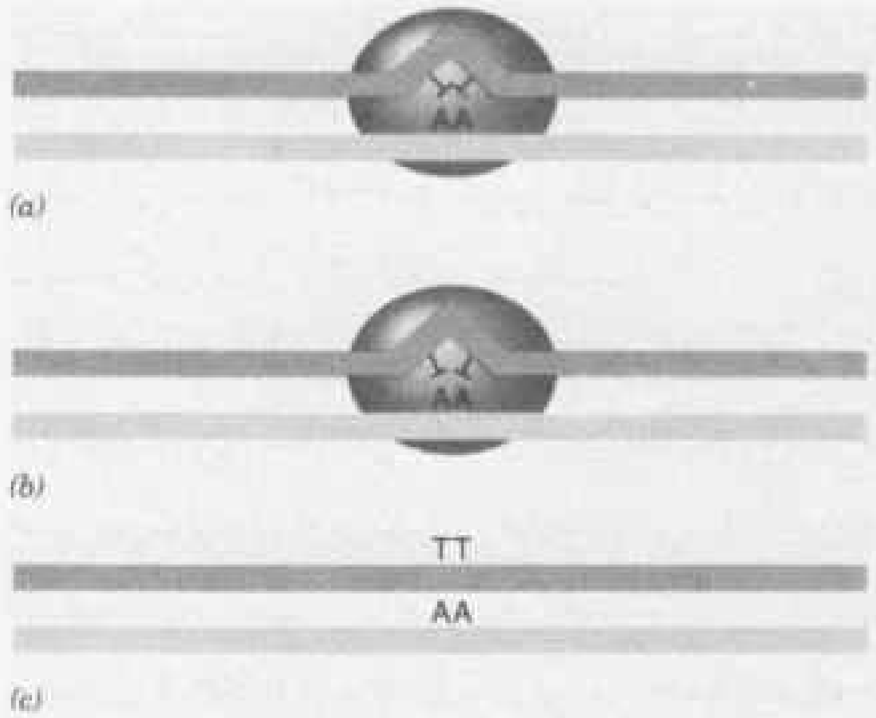
فتوراکتیواسیون

فتوراکتیواسیون[2] یک مکانیسم اختصاصی برای ترمیم دیمرهای پیریمیدینی سیکلوبوتان (شکل d۲۳-۴ و e) است که ضایعات اصلی حاصل از تشعشع ماوراءبنفش می‌باشند. این مکانیسم یک برگشت مستقیم ضایعه است. یک آنزیم تخصص‌یافته تحت عنوان



شکل ۲۹-۴ **دمتیلاسیون مستقیم.** (a) جفت باز C:G طبیعی. (b) جفت باز T : O^6 – methylG. این جفت باز امکان قرارگیری یک T در مقابل O^6 – methyl G را در هنگام همانندسازی فراهم می‌سازد و منجر به تولید یک جهش در نسل بعدی می‌شود. (c) متیل گوانین متیل‌ترانسفراز (MGMT) می‌تواند به O^6 – methylG اتصال یابد. (d) MGMT گروه متیل را از O^6 گوانین به یک گروه سولفیدریل خود پروتئین MGMT انتقال داده و یک G سالم بر جا می‌گذارد. پروتئین MGMT متیله غیرفعال است و بعد از اتصال به اوبی‌کوئیتین، تخریب می‌گردد.

1. O^6-methyl guanine methyltransferase
2. Photoreactivation



شکل ۳۰-۴ فتوراکتیواسیون. (a) فتولیاز به دیمر پیریمیدینی سیکلوبوتان اتصال می‌یابد؛ برای این مرحله نیاز به نور نیست. (b) این کمپلکس نور را جذب می‌کند که نتیجه آن تجزیه پیوندهایی است که پیریمیدین‌های مجاور را به یکدیگر متصل کرده‌اند. (c) سپس آنزیم می‌تواند از DNA جدا شود.

فتولیاز به آسیب اتصال می‌یابد (شکل ۳۰-۴). با جذب نور، فتولیاز برگشت پیوندهای موجود در بین پیریمیدین‌های مجاور را کاتالیز نموده و DNA را دقیقاً به شکل قبل از تولید دیمر برمی‌گرداند. این واکنش نوعی برگردانی مستقیم آسیب است. با وجود این که فتوراکتیواسیون اهمیت زیادی در اکثر موجودات دارد، ولی در پستانداران قابل توجه نمی‌باشد.

ضایعاتی که می‌توانند همانندسازی را متوقف سازند

صحت و توانایی غلط‌گیری DNA پلیمرازها عموماً مانع از آن می‌شود که این آنزیم‌ها نوکلئوتیدی را در مقابل بازهای آسیب‌دیده قرار دهند؛ این آنزیم‌ها قبل از قراردادن یک نوکلئوتید و عبور از آن، نیاز به ایجاد جفت باز بسیار صحیح دارند. لذا وقتی یک کمپلکس همانندسازی به ضایعه‌ای در رشته الگو می‌رسد، متوقف می‌گردد. سه راه برای ادامه همانند-سازی وجود دارد: این کمپلکس می‌تواند (a) از هم پاشیده و یا به عقب برگردد تا امکان ترمیم ضایعه و سپس ادامه مجدد سنتز فراهم گردد، (b) مستقیماً از روی ضایعه عبور کند، یا (c) از روی ضایعه بپرد و دوباره سنتز را بعد از آن ادامه دهد (یک شکاف را در رشته دختر باقی بگذارد). تمامی این سه مکانیسم مورد استفاده قرار می‌گیرند و هر کدام از آنها مزایا و معایبی دارند.

سنتز بای‌پی (عبور از ضایعه)

یک پلیمراز غلط‌گیر با صحت بسیار بالا نمی‌تواند نوکلئوتیدی را در مقابل بازهای آسیب دیده قرار دهد و به همین دلیل سنتز متوقف می‌گردد (و یا همان‌طور که در ادامه شرح داده خواهد شد، پلیمراز یک شکاف در پشت سر خود باقی می‌گذارد). هرچند فرایندی تحت عنوان **سنتز راه فرعی**[1] یا **سنتز با عبور از ضایعه**[2] می‌تواند امکان ادامه همانندسازی به بعد از ضایعه را فراهم سازد (شکل ۳۱-۴). خانواده‌ای از DNA پلیمرازهای «مستعد-



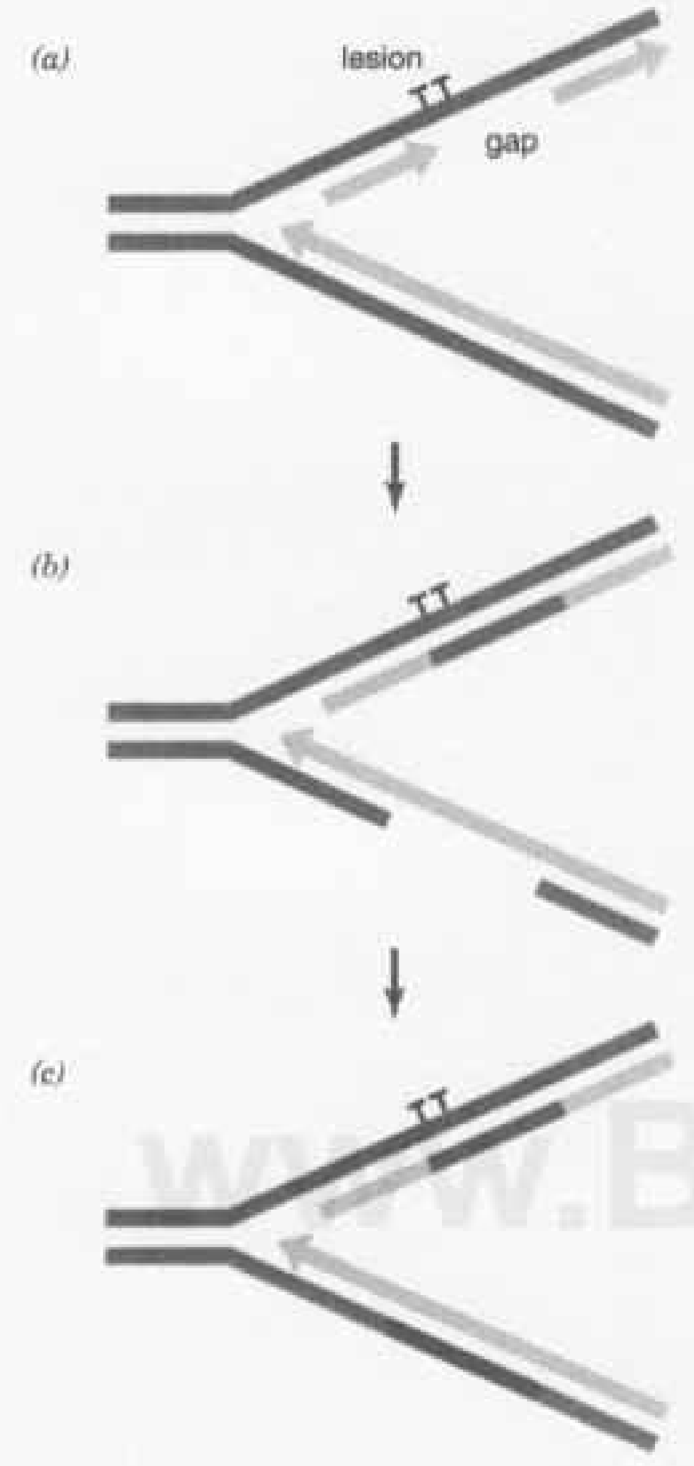
شکل ۳۱-۴ سنتز بای‌پس (با عبور از ضایعه). (a) آسیب به الگو عموماً سبب توقف DNA پلیمراز همانندسازی می‌شود، زیرا نمی‌تواند نوکلئوتیدی را در مقابل ضایعه‌ای در رشته غیرکدکننده قرار دهد که تغییر شکل داده است. (b) DNA پلیمرازهای تخصص‌یافته با ویژگی کمتر (جدول ۲-۴ را ببینید) می‌توانند نوکلئوتیدهایی را در برابر ضایعات موجود در الگو قرار دهند و به موجب آن امکان عبور از آسیب و سنتز یک رشته دختر فاقد شکاف را فراهم سازند. ویژگی کمتر و عدم وجود غلط‌گیری در این پلیمرازها به این معنی است که اغلب خطاهایی ایجاد می‌شود (پتانسیل جهش دارند). این پلیمرازها براحتی از DNA جدا می‌شوند، لذا طول DNAای که سنتز می‌کنند معمولاً کوتاه است.

1. Bypass synthesis
2. Translesion synthesis

خطا[1]» یا «صحت پایین[2]» وجود دارند که فاقد فعالیت غلط‌گیری هستند (جدول ۲-۴). به‌واسطه صحت پایین، این پلیمرازها می‌توانند نوکلئوتیدهایی را در مقابل بازهای آسیب دیده قرار داده و به موجب آن امکان ادامه همانندسازی را فراهم سازند. کاهش صحت این آنزیم‌ها منجر به افزایش احتمال قراردادن نوکلئوتید غلط در مقابل ضایعه و در هر DNAای می‌گردد که توسط این پلیمرازها ساخته می‌شود. شواهد نشان می‌دهند که عواقب زیان‌آور این فرایند کمتر از توقف طولانی (یا دائمی) همانندسازی است.

در *E.coli*، صحت آنزیم DNA پلیمراز IV (کمپلکس $UmuD'_2C$) به مراتب کمتر از DNA پلیمرازهای III و I است که به‌طور طبیعی همانندسازی را انجام می‌دهند. آنها پیشروندگی پایینی دارند و عموماً قبل از جداشدن از DNA، کمتر از ۱۰ نوکلئوتید را در محل قرار می‌دهند؛ این موضوع سبب محدودیت در میزان جهش‌هایی می‌شود که ایجاد می‌گردد. این آنزیم‌ها به‌عنوان بخشی از پاسخ SOS القاء می‌شوند که در ادامه شرح داده خواهد شد. این موضوع تضمین می‌نماید که سنتز راه فرعی (عبور از ضایعه) مستعد-خطا تنها زمانی انجام شود که آنقدر آسیب به DNA وارد شده باشد که پاسخ SOS را سبب شود و در نتیجه خطر ایجاد جهش محدود به شرایطی می‌شود که در آن بقاء سلول شدیداً در خطر می‌باشد.

اوکاریوت‌ها نیز پلیمرازهای مستعد-خطایی دارند که سنتز راه فرعی (عبور از ضایعه) را انجام می‌دهند (جدول ۲-۴). DNA پلیمراز η غالباً A را در مقابل دیمرهای تیمین حاصل از تشعشع UV قرار می‌دهد؛ از آنجایی که A نوکلئوتید مناسب برای قرارگیری در مقابل T این دیمر می‌باشد، احتمال جهش‌زایی در این نوع ضایعات کاهش می‌یابد (ولی از بین نمی‌رود). پلیمراز η فاقد ظرفیت غلط‌گیری ذاتی است و یک عدم‌تطابق را به ازاء هر ۲۰ تا ۴۰۰ نوکلئوتید سنتزشده ایجاد می‌کند که ضرورت کنترل شدید فعالیت آن را نشان می‌دهد. DNA پلیمراز *i* نوکلئوتیدها را در مقابل سایر ضایعاتی قرار می‌دهد که شکل DNA را تغییر می‌دهند و یا از نوع ضایعاتی نظیر جایگاه‌های آبازی هستند که به‌طور طبیعی نمی‌توانند به‌عنوان الگو عمل کنند. به نظر می‌رسد این پلیمرازها همراه با DNA پلیمراز ξ عمل می‌کنند که خودش نوکلئوتیدها را در مقابل ضایعات قرار نمی‌دهد، ولی می‌تواند ساختمان‌های حاصل از سایر پلیمرازهای راه فرعی را امتداد دهد تا این که پلیمراز طبیعی همانندسازی را ادامه دهد. این پلیمرازهای راه فرعی از انواع توزیعی هستند، لذا ناحیه‌ای که احتمال این عدم‌تطابق در آن وجود دارد، معمولاً کوچک می‌باشد و این موضوع سبب محدودیت ایجاد جهش می‌شود.



شکل ۳۲-۴ ترمیم شکاف رشته-دختر. (a) شکاف‌هایی در DNA تازه همانندسازی شده در محل‌هایی باقی می‌مانند که در آنها چنگال‌های همانندسازی به‌واسطه وجود ضایعات متوقف می‌گردند. از آنجایی‌که ضایعه فاقد DNA مخالف سالم است، سوبسترایی برای ترمیم برداشتی نمی‌باشد. (b) نوترکیبی به رشته مادری با قطبیت یکسان (برنزه تیره) امکان پرنمودن شکاف موجود در رشته دختر (برنزه روشن) را فراهم می‌سازد. بدین‌ترتیب شکافی در رشته مادر باقی می‌ماند. (c) شکاف موجود در رشته مادری می‌تواند توسط یک DNA پلیمراز پر شود (ارغوانی)، زیرا یک الگوی سالم در مقابل آن وجود دارد. نتیجه ترمیم شکاف در رشته دختر است، ولی ضایعه باقی می‌ماند. توجه داشته باشید که حالا ضایعه می‌تواند با ترمیم برداشتی ترمیم شود، زیرا هم اکنون در مقابل آن رشته سالم قرار دارد.

ترمیم شکاف رشته-دختر

در صورتی که سنتز DNA به‌واسطه یک ضایعه متوقف شود ولی دوباره بعد از این ضایعه شروع شود، شکافی در DNA به‌وجود می‌آید (شکل ۳۲-۴). تصور این حالت در رشته

1. Error-prone 2. Relaxed stringency

ناپیوسته ساده‌تر می‌باشد که در آن می‌تواند تنها با جدایی پلیمراز از محل انسداد و شروع دوباره از قطعه اوکازاکی بعدی با مکانیسم همانندسازی طبیعی رخ دهد. شکاف‌های موجود در DNA می‌توانند کشنده باشند. ضایعه موجود در مقابل یک شکاف، سوبسترایی برای ترمیم برداشتی نیست، زیرا رشته سالمی در مقابل ضایعه برای کدنمودن اطلاعات مورد نیاز ترمیم وجود ندارد. **ترمیم شکاف رشته-دختر**[1] (قبلا نوترکیبی بعد از همانندسازی[2] نامیده می‌شد) ضایعه ایجادکننده شکاف را برداشت نمی‌کند، ولی شکاف را ترمیم می‌نماید. این موضوع سبب حفاظت سلول در برابر آسیب احتمالی می‌شود که شکاف می‌تواند به‌وجود آورد و همچنین سوبسترایی را برای ترمیم برداشتی به‌وجود می‌آورد تا بر روی خود ضایعه عمل کند.

ترمیم شکاف رشته-دختر به‌واسطه نوترکیبی انجام می‌شود. DNA تک-رشته، نظیر نوعی که در مقابل یک شکاف وجود دارد، نوترکیب‌زا[3] است؛ یعنی نوترکیبی را تحریک می‌کند. نوترکیبی بین دو دورشته‌ای که جدیداً تولید شده‌اند، امکان انتقال یک قطعه از رشته مادری طبیعی به داخل شکاف را فراهم می‌سازد (شکل a۳۲-۴؛ رشته مادری در یک سمت چنگال، همان قطبیت رشته دختر در سمت دیگر را دارد). نتیجه باقی‌ماندن یک شکاف در رشته مادری است که این قطعه را داده است (شکل b۳۲-۴)، ولی از آنجایی آن رشته یک رشته طبیعی از DNA مخالف دارد، این شکاف می‌تواند براحتی توسط DNA پلیمراز پر و توسط یک DNA لیگاز دوخته شود (شکل c۳۲-۴). نتیجه ترمیم شکاف می‌باشد، هر چند ضایعه هنوز باقی مانده است. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، با این کونفیگوراسیون، این ضایعه سوبسترایی برای ترمیم برداشتی است.

بازشدن و ترمیم چنگال‌های همانندسازی

برای یک کمپلکس همانندسازی که سنتز رشته ناپیوسته را در محل یک ضایعه متوقف کرده است، ساده است تا با به‌کارگیری مکانیسم‌های طبیعی همانندسازی DNA (ص.۱۹۶) دوباره سنتز را از قطعه اوکازاکی بعدی از سر بگیرد. شروع مجدد رشته پیوسته بعد از محل انسداد، مشکل‌تر می‌باشد، زیرا شروع در مبداء همانندسازی شدیداً تحت کنترل قرار دارد. در این حالت به‌نظر می‌رسد چنگال‌های همانندسازی می‌توانند با بازنمودن رشته‌های دختر پسرفت کنند که امکان ترمیم ضایعه و شروع مجدد همانندسازی را فراهم می‌سازد. در *E.coli*، RecA به نواحی تک-رشته در چنگال‌های همانندسازی متوقف‌شده اتصال یافته و یکپارچگی DNA را حفظ می‌کند. چنگال همانندسازی می‌تواند به‌طریق مهاجرت شاخه، پسرفت نماید در حالی که تحت حفاظت RecA قرار دارد، لذا امکان برداشت ضایعه با مکانیسم‌های ترمیمی NER و BER فراهم می‌شود. سپس با معکوس‌شدن مهاجرت شاخه یا تخریب رشته جایگزین‌شده، امکان از سرگرفتن سنتز فراهم می‌شود. هنوز برخی جزئیات، نظیر این که آیا دستگاه همانندسازی می‌تواند با رشته جایگزین‌شده باقی بماند

1. Daughter-strand gap repair 2. Postreplication recombination 3. Recombinogenic

یا این که لازم است کمپلکس همانندسازی دوباره به طریق وابسته به مبداء همایش یابد، مشخص نمی‌باشد.

ترمیم شکست دو-رشته

شکست‌های دو-رشته[1] **(DSBs)** در DNA حوادثی هستند که می‌توانند کشنده باشند. این حوادث نوترکیبی ژنتیکی را تحریک می‌کنند که می‌توانند منجر به جابه‌جایی‌های کروموزومی شوند، و DSBهای ترمیم‌نشده منجر به شکستن کروموزوم‌ها و مرگ می‌گردند. شکست‌های دو-رشته توسط عوامل متعددی، به‌خصوص تشعشع یونیزان، گونه‌های واکنشگر اکسیژن، و عوامل شیمی‌درمانی رخ می‌دهند که تولید رادیکال‌های آزاد اکسیداتیو (نظیر بلئومایسین[2]) می‌کنند و یا سمومی برای توپوایزومرازها می‌باشند. وقتی چنگال همانندسازی با یک شکست تک-رشته مواجه می‌شود، آن شکست به یک شکست دو-رشته تبدیل می‌گردد. سلول‌ها مکانیسم‌هایی نظیر کنترل در نقاط وارسی[3] را دارند که در حضور آسیب همانندسازی را آهسته یا متوقف می‌سازند تا زمان لازم برای ترمیم فراهم گردد و احتمال مواجه با یک شکست تک-رشته به حداقل برسد. با این وجود، برآورد شده است که طی یک دوره همانندسازی، حدود ۱۰ شکست دو-رشته در سلول‌های پستانداران تولید می‌شود.

مسیر اصلی برای بقاء سلول، مستلزم ترمیم شکست دو-رشته به طریق نوترکیبی هُمولوگوس (قبلا شرح داده شد؛ شکل ۲۴-۴) یا اتصال انتهای غیرهُمولوگوس می‌باشد. در مخمر، نوترکیبی هُمولوگوس غالب است؛ در سلول‌های پستانداران، اتصال انتهای غیر-هُمولوگوس غالب می‌باشد.

تنظیم ترمیم DNA: تنظیم SOS

در *E.coli* آسیب DNA سبب آغاز **پاسخ SOS**[4] می‌شود که تغییری در بیان ژن‌ها در جهت کمک به ترمیم آسیب‌ها می‌باشد. پاسخ SOS نوعی القاء هماهنگ ژن‌های متعددی است که رونویسی آنها حداقل تا حدودی توسط یک سرکوبگر مشترک، به‌نام **LexA**، تنظیم می‌شود. گروهی از اپرون‌هایی که تحت کنترل یک سرکوبگر مشترک قرار دارند را یک **رگیولون**[5] می‌گویند. از میان ژن‌های موجود در رگیولون SOS می‌توان به **uvrA**، **uvrB**، **uvrC**، **recA** و خود **LexA** اشاره کرد. بسیاری از ژن‌های موجود در رگیولون SOS، میزان بیان دائمی پایین را دارند، زیرا سرکوب توسط LexA کامل نبوده و برخی از این ژن‌ها پروموترهای دیگری دارند که توسط LexA سرکوب نمی‌شوند.

پاسخ SOS توسط قطعات بلندی از DNA تک-رشته، نظیر انواع موجود در شکاف‌هایی که بعد از توقف همانندسازی به‌وجود آمده‌اند، آغاز می‌شود (شکل ۳۳-۴). وقتی چنین قطعه‌ای تولید می‌شود، میزان دائمی پایین پروتئین RecA می‌تواند به‌طریق تعاونی در طول

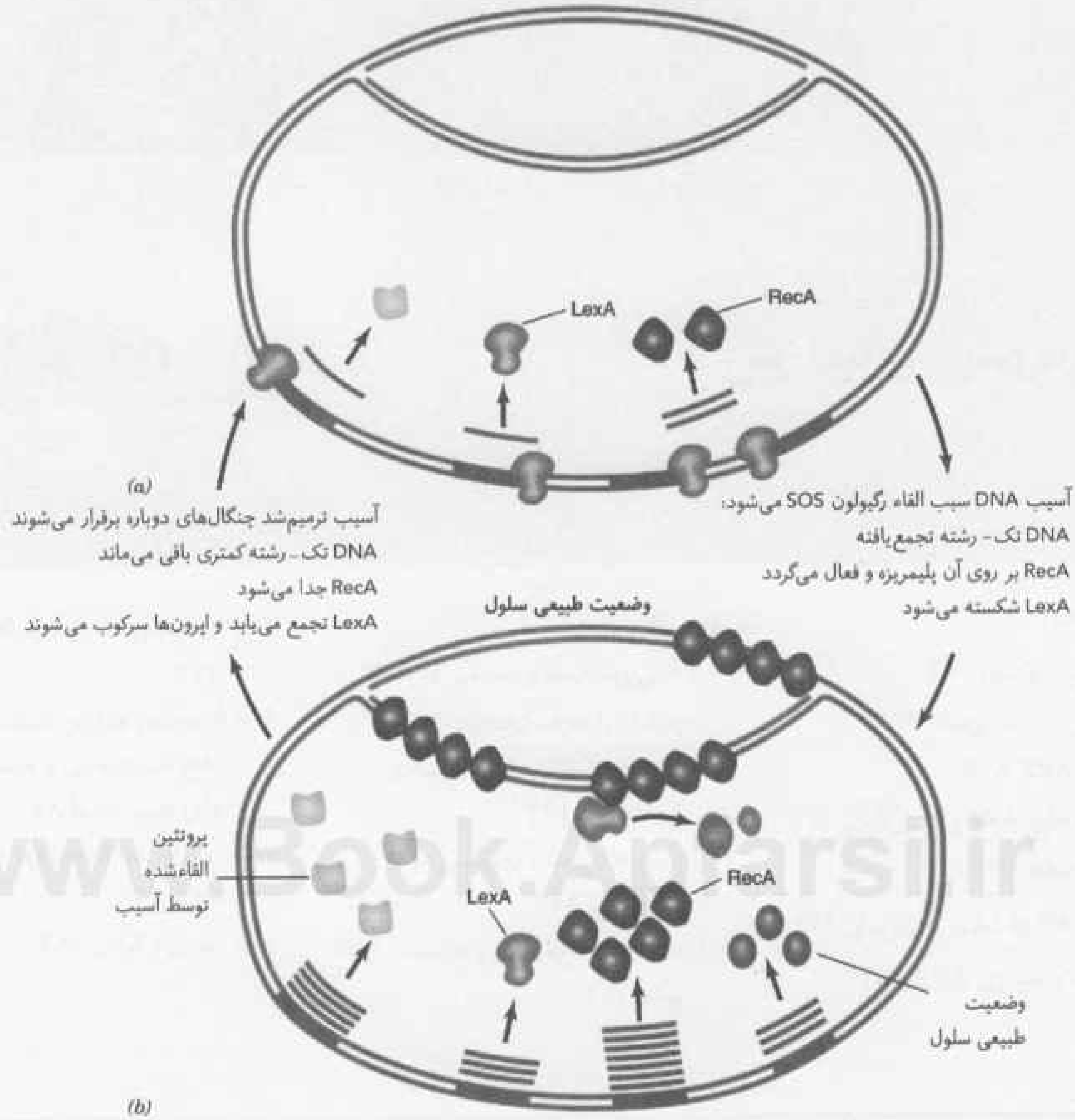
1. Double-strand breaks   2. Bleomycin   3. Checkpoints   4. SOS response   5. Regulon

DNA تک-رشته پلیمریزه شده و یک فیلمان نوکلئوپروتئینی را به‌وجود آورد. در این حالت، این فیلمان فعال شده و به **LexA** اتصال یافته و سبب افزایش سرعت تجزیه **LexA** به قطعات غیرفعال می‌شود. بدین‌ترتیب سرکوب برداشت شده و سنتز سریع ژن‌هایی صورت می‌پذیرد که در حالت طبیعی توسط **LexA** سرکوب می‌شدند. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، **RecA** در ترمیم شکاف دو-رشته و حفاظت از چنگال همانندسازی شرکت می‌کند. سایر ژن‌هایی که به‌واسطه آسیب القاء می‌شوند (ژن‌های **din**)، پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند که در ترمیم **DNA** و بهبود سلول کمک نموده و تا زمان تکمیل ترمیم، مانع شروع چنگال‌های همانندسازی جدید و تقسیم سلولی می‌شود (شکل ۳۳-۴).

خودتنظیمی **LexA** براساس یک قوس پس‌نوردی ساده می‌باشد که به شکل مؤثری امکان پاسخ سریع ولی گذرا به آسیب **DNA** را فراهم می‌سازد. وقتی پروتئین **LexA** تجزیه می‌شود، ژن‌های متعدد رگیولون **SOS** از جمله خود **LexA** القاء می‌شود، لذا میزان **LexA** تولیدی به میزان قابل‌توجهی افزایش پیدا می‌کند. هر چند، در حالی که همچنان آسیب **DNA** وجود دارد و پروتئین **RecA** همچنان فعال است، پروتئین **LexA** تجزیه شده و نمی‌تواند ژن‌های متعدد رگیولون **SOS** را سرکوب کند. وقتی آسیب ترمیم شد، میزان **RecA** فعال کاهش یافته و بنابراین تجزیه **LexA** کم می‌شود. با افزایش میزان، **LexA** به اپراتورهای مربوط به ژن‌های **din** اتصال یافته و به‌تدریج پاسخ **SOS** را خاموش می‌کند.

واژه‌های کلیدی

رشته‌های موازی ناهمسو	RNA هیبریداز (RNase H)	نوترکیبی هُمولوگوس	ترمیم برداشتی
قالب	DNA لیگاز	نوترکیبی غیر-هُمولوگوس	ترمیم برداشت نوکلئوتیدی
DNA پلیمرازها	شکست دو-رشته	اتصال هالیدی	ترمیم برداشت بازی
پرایماز	ایجاد ابرفنر	مهاجرت شاخه	ترمیم تکه کوتاه
غلط‌گیری	توپوایزومراز	هترودوبلکس	ترمیم جفت‌شده با رونویسی
RNA پلیمراز	واکنش پیشرونده	تبدیل ژنی	ترمیم بدتطابق
همانندسازی نیمه‌حفظ‌شده	رشته پیوسته	توالی الحاقی	فعال‌سازی نوری
ترانس‌استریفیکاسیون	رشته ناپیوسته	جابه‌جایی	سنتز عبوری
فعالیت اگزونوکلئوتیدی	DNA ژیراز	جهش بدمعنی	ترمیم شکاف رشته-دختر
هلیکاز	مبداء همانندسازی	جهش بی‌معنی	پاسخ SOS
چنگال همانندسازی	همانندسازی دوجهته	جهش نقطه‌ای	ترانس‌کریپتاز معکوس
سنتز نیمه-ناپیوسته	کمپلکس شناسایی مبداء (ORC)	جهش تغییرقالب	
قطعه اوکازاکی	تلومراز	ترمیم DNA	



شکل ۳۳-۴ تنظیم ترمیم و بازیافت DNA در *E.coli*، پاسخ SOS. (*a*) در سلول‌های آسیب‌ندیده، گروهی از اپرون‌ها که رگیولون SOS را تشکیل می‌دهند، توسط یک سرکوبگر مشترک، یعنی LexA، تنظیم می‌گردند. این رگیولون شامل خود ژن LexA (خودتنظیمی) و ژن recA، به همراه تعداد زیادی ژن کدکننده آنزیم‌هایی می‌باشد که در جهت ترمیم آسیب عمل می‌کنند. حتی در حضور پروتئین LexA، رونویسی دائمی پایین بسیاری از این ژن‌ها، شامل LexA و recA، وجود دارد. (*b*) آسیب سبب توقف چنگال‌های همانندسازی شده و به موجب آن DNA تک- رشته باقی می‌ماند. RecA به DNA تک ـ رشته اتصال یافته و فعال می‌گردد. بدین ترتیب، RecA به شکستن LexA کمک می‌کند. قطعات شکسته‌شده LexA نمی‌توانند به اپراتورها اتصال یابند، لذا مجموعه کامل اپرون‌ها القاء می‌شود. RecA بیشتری همراه با پروتئین‌های دیگری نظیر LexA تولید می‌شود. تا زمانی که آسیب وجود دارد و RecA فعال‌شده باقی می‌ماند، LexA به شکسته‌شدن ادامه می‌دهد و به همین دلیل اپرون‌ها روشن باقی می‌مانند. وقتی آسیب ترمیم شد، RecA غیرفعال شده و دیگر به تجزیه LexA کمک نمی‌کند، لذا LexA فعال تجمع یافته و ژن‌های موجود در این رگیولون را خاموش می‌کند.



۵



RNA: رونویسی و پردازش RNA

مفاهیم کلیدی

- رونویسی سنتز RNAای است که توالی آن مکمل توالی الگوی DNA است. رونویسی از یک توالی پروموتری آغاز و در جهت '۵ به '۳ پیشرفت می‌کند.
- تمامی انواع RNA پلیمرازها که رونویسی را آغاز می‌کنند، جد مشترکی دارند.
- RNA پلیمراز باکتریایی حاوی یک زیرواحد اختصاصی (سیگما) است؛ زیرواحدهای سیگمای مختلف، کلاس‌های پروموتری مختلفی را شناسایی می‌کنند.
- شروع اوکاریوتی با فراخوانی RNA پلیمراز و فاکتورهای پروتئینی فرعی به پروموترهایی آغاز می‌گردد که در نواحی قابل‌دسترسی کرماتین قرار دارند.
- رونوشت‌های RNA با شکستن، افزودن و تغییر بازی، تغییر داده می‌شوند.
- اکثر رونوشت‌های mRNA اوکاریوتی در جهت سنتز یک کلاهک '۵ و توالی پلی(A)'۳ و همچنین برداشت اینترون‌ها، پردازش می‌شوند. ذرات ریبونوکلئوپروتئینی در پردازش همکاری دارند.
- ملکول‌های RNA کوتاه می‌توانند با مهار بیان ژن، امکان تنظیم بعد از رونویسی ژن را فراهم کنند.
- هیچ مکانیسم ترمیمی برای RNA وجود ندارد. لذا تمامی کلاس‌های RNA نوسازی می‌شوند. اگزو- و آندونوکلئازها RNA را برای استفاده مجدد به نوکلئوتیدها هیدرولیز می‌کنند.
- ملکول‌های RNA مختلف با سرعت‌های متفاوت و با به‌کارگیری مکانیسم‌های متفاوت نوسازی می‌شوند.

۱-۵ • مقدمه

سنتز یک ملکول RNA مستلزم نسخه‌برداری یک رشته از روی توالی الگو براساس ایجاد جفت باز واتسون-کریک بین نوکلئوتیدهای الگو (معمولاً DNA) و نوکلئوتیدهایی است که در داخل **رونوشت** قرار داده می‌شوند. احتمالاً شروع رونویسی توسط RNA پلیمراز مهمترین رویداد در کنترل بیان ژن می‌باشد. شروع رونویسی نیاز به توالی‌های تخصص‌یافته‌ای از DNA، به‌نام **پروموتر**، دارد که محل شروع سنتز RNA را تعیین می‌کند. شناسایی توالی‌های پروموتری مستلزم تماس‌های ملکولی بین DNA و **فاکتورهای** پروتئینی است. این فاکتورها از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی و سایر تماس‌ها، به RNA پلیمراز و نوکلئوتیدهای DNA اتصال می‌یابند. در هنگام یا بعد از طویل‌سازی رونویسی، واکنش‌های **پردازش RNA** منجر به برداشت، افزودن یا تغییر نوکلئوتیدهای موجود در رونوشت اولیه می‌شوند. این واکنش‌ها می‌توانند همزمان با رونویسی انجام شوند. به عبارت دیگر، بر روی قسمت‌هایی از رونوشت انجام می‌شوند، در حالی که توالی‌های فرودست همچنان در حال رونویسی هستند.

۲-۵ • مکانیسم رونویسی

رونویسی فرایند ابتدایی سنتز RNA است

رونویسی فرایند سنتز زنجیر RNA از الگوی DNA می‌باشد. واکنش‌های رونویسی به شکل زیر انجام می‌شوند:

$$\text{DNA الگوی} + n(\text{NTP}) \rightarrow \text{pppN(pN)}_{n-1} + (n-1)\text{PP}_i + \text{DNA الگوی}$$

آنزیم‌هایی که این واکنش را کاتالیز می‌کنند، RNA پلیمراز هستند؛ مهم است بدانیم که این آنزیم همانند DNA پلیمرازها، کاملاً وابسته به الگو هستند. هرچند برخلاف DNA پلیمرازها، RNA پلیمرازها نیازی به ملکول پرایمر ندارند. واکنش RNA پلیمراز به کمک دو عامل به جلو رانده می‌شود: اول، $5'$ α– نوکلئوتید فسفات مربوط به ریبونوکلئوزید تری‌فسفات از یک فسفات انیدریدی به یک پیوند فسفودی‌استری با یک تغییر انرژی آزاد ($\Delta G'$) حدود ۱۲٫۵ kJ/mol (۳ kcal/mol) در شرایط استاندارد، تبدیل می‌شود. دوم، پیروفسفات، PPi، آزادشده توسط پیروفسفاتاز به دو ملکول فسفات تجزیه می‌شود، لذا غلظت پیروفسفات پایین است و تشکیل پیوند فسفودی‌استری نسبت به شرایط استاندارد مساعدتر می‌باشد (ص ۸۵۸).

از آنجایی که برای سنتز RNA نیاز به یک الگوی DNA است، رونویسی اوکاریوتی در هسته یا ماتریکس میتوکندری یا کلروپلاست رخ می‌دهد. در هنگام رونویسی، تغییرات ساختمانی در DNA رخ می‌دهد. در کروموزوم‌های پلی‌تن[1] *Drosophila* ژن‌هایی که از نظر رونویسی فعال هستند، با میکروسکوپ نوری به صورت نواحی پُف‌کرده[2] مشاهده

1. Polytene 2. Puffs

می‌گردند که متفاوت از کروماتین متراکم غیرفعال می‌باشد. در حقیقت، ژن‌های فعال در ساختمان‌های کروماتینی تغییریافته‌ای وجود دارند که تراکم کمتری دارند و این موضوع براساس دسترسی معرف‌های شیمیایی یا آنزیم‌ها به این ژن‌ها آشکار می‌گردد. هم در پروکاریوت‌ها و هم در اوکاریوت‌ها، با پیشرفت کمپلکس رونویسی در طول DNA، مارپیچ دورشته DNA به‌طور موقتی باز می‌شود.

از آنجایی که DNA به صورت یک مارپیچ دورشته DNA است، باز و جداشدن دو رشته آن از یکدیگر برای فراهم‌سازی امکان ایجاد جفت‌بازهای واتسون-کریک بین رشته الگوی DNA و نوکلئوتیدهای موجود در RNA تازه سنتزشده، ضروری می‌باشد. بازشدن موضعی DNA امکان پیشرفت رونویسی بدون پیچیدن محصول RNA به دور رشته الگوی DNA را فراهم می‌سازد. توپوایزومرازهای نوع I و نوع II (ص ۲۰۷) در این تغییرات شدت مارپیچی‌بودن DNA همکاری دارند.

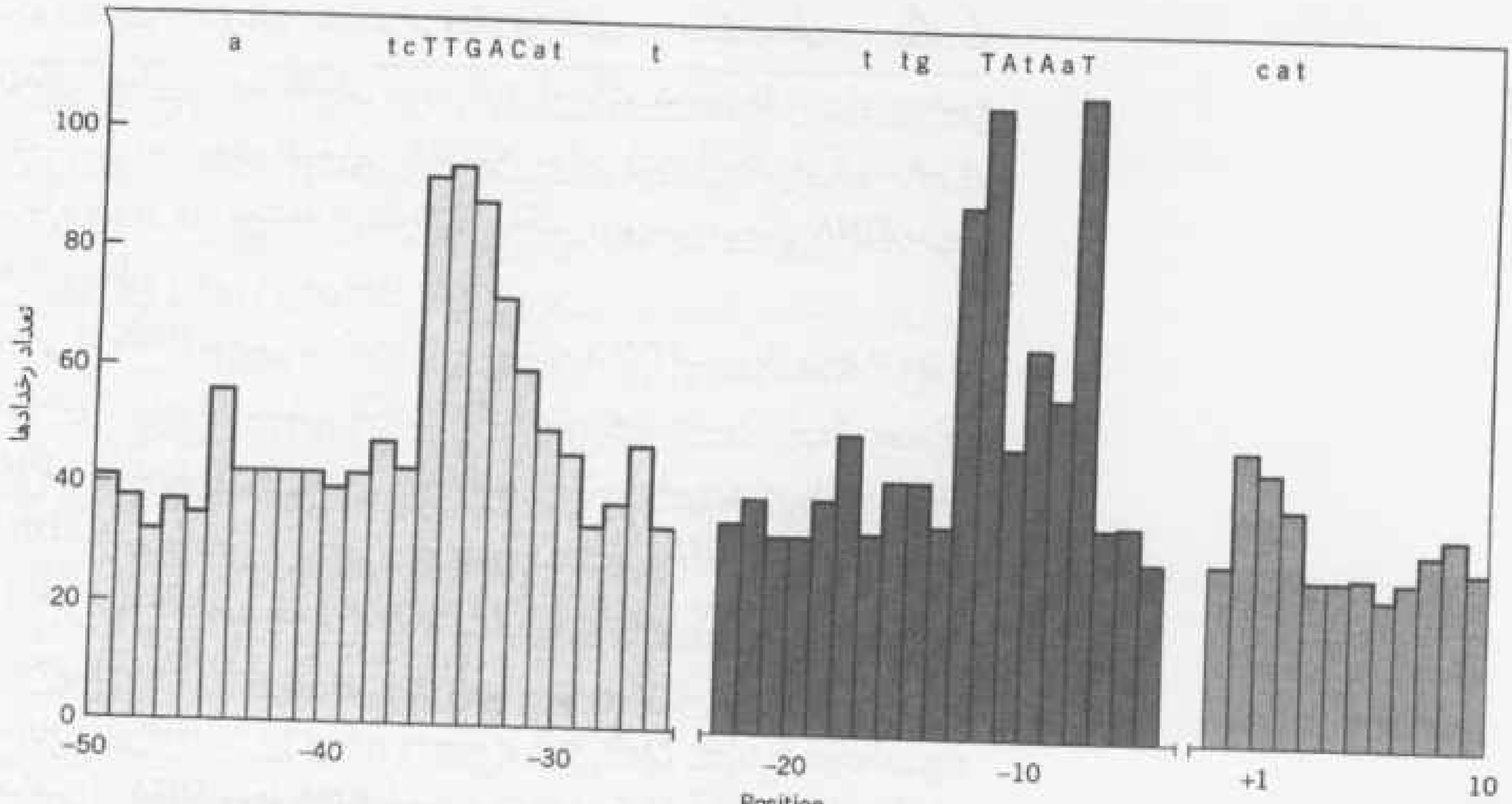
فرایند رونویسی عموماً به سه قسمت تقسیم می‌شود: **شروع**[1] اشاره به شناسایی یک توالی اختصاصی از DNA توسط RNA پلیمراز و شروع فرایند تشکیل پیوند دارد. **طویل‌سازی**[2] سنتز واقعی زنجیر RNA است که به‌دنبال آن **خاتمه**[3] و آزادسازی زنجیر رخ می‌دهد.

اطلاعات موجود در توالی DNA پیام سنتز RNA را ارسال می‌کنند

پیشتر ژنوم انسانی به RNA رونویسی نمی‌شود. حتی در باکتری‌ها که در آنها تقریباً تمامی DNA برای کد محصولات ژنی است، تمامی ژن‌ها در هر زمانی بیان نمی‌شوند. لذا لازم است ملکول‌های RNA پلیمراز بین ژن‌ها و غیرژن‌های موجود در DNA، و همچنین بین ژن‌هایی که لازم است رونویسی شوند از آنهایی که ضرورتی برای رونویسی ندارند، تمایز قائل شود.

شروع رونویسی با شناسایی یک **توالی پروموتری** در الگوی DNA آغاز می‌شود. معمولاً پروموترها به فاصله کوتاهی در فرادست نوکلئوتید محل شروع رونویسی قرار دارند. پروموترهای مختلف اغلب حاوی توالی‌های مشابه هستند که امکان شناسایی یک توالی پروموتری «مشترک[4]» را فراهم می‌سازد (شکل ۱-۵) که از آن به بعد پروموترهای واقعی به‌میزان متفاوتی با یکدیگر اختلاف دارند. با وجود این که پروموترهای پروکاریوتی و اوکاریوتی با یکدیگر متفاوت هستند، توالی‌های حفظ شده‌ای در هر دو گروه از پروموترها وجود دارند. برخی توالی‌های DNA رونویسی را تحریک می‌کنند، ولی دور از محل شروع قرار دارند و برخی از اینها می‌توانند بدون توجه به فاصله، موقعیت یا جهت خود نسبت به جایگاه شروع رونویسی، سبب تحریک رونویسی شوند. این توالی‌های تنظیمی را **فزاینده**[5] گویند. فزاینده‌ها سنتز برخی ملکول‌های RNA پروکاریوتی و اکثر، اگر نه تمام، ملکول‌های mRNA اوکاریوتی را تحریک می‌کنند. فزاینده‌ها از طریق اتصال به فاکتورهای پروتئینی اختصاصی، به

1. Initiation 2. Elongation 3. Termination 4. Consensus 5. Enhancer



A	28 38 30 37 35	56 42 42 37 42	39 18 25 26 2	6 2 72 26 50	26 34 25 26 31	20 39 33	33 39 23 29 16	23 19 2 106 29	66 57 1 35 23	31	20 9	45 16 24 25 26	24 24 32 35 26
T	41 33 32 25 34	22 35 35 42 27	32 42 47 14 92	94 11 19 15 37	46 36 38 48 34	35 28 28	27 39 51 34 43	26 31 89 3 69	15 19 108 31 29	21	16 22	2 42 27 23 20	25 27 15 16 29
G	16 11 29 19 21	18 13 21 9 19	24 26 29 29 11	6 88 3 11 17	15 21 26 21 27	23 24 27	25 22 23 29 28	43 35 11 1 18	17 14 0 33 24	30	21 8	37 5 12 27 22	17 20 24 21 16
C	22 27 18 29 20	14 20 12 22 23	16 25 10 43 7	6 11 18 60 8	25 23 23 17 20	34 21 24	27 22 25 20 25	20 27 10 2 16	14 22 3 13 36	30	29 49	4 25 25 13 18	22 17 17 16 17

شکل ۱-۵ یک توالی مشترک برای پروموترهای اوکاریوتی. توالی‌های مربوط به تعداد زیادی پروموتر از *E.coli* گردآوری و تعداد دفعاتی که هر باز در موقعیت خاصی در پروموتر قرار داشت، جدول‌بندی شدند. هیستوگرام تعداد رخدادهای مربوط به فراوانترین باز در هر موقعیت را به نمایش گذاشته است. این آنالیز امکان تعریف یک توالی مشترک برای پروموترهای *E.coli* را فراهم می‌سازد که توسط هولوآنزیم RNA پلیمراز حاوی σ^{70} مورد شناسایی قرار می‌گیرد. این توالی مشترک در بالا، به‌صورت بازهای شدیداً حفظ‌شده با حروف بزرگ و بازهای کمتر حفظ‌شده با حروف کوچک، نشان داده شده است.

نام فعال‌کننده[1]، عمل می‌کنند. وقتی یک فعال‌کننده به یک فزاینده اتصال می‌یابد، تغییری در ساختمان الگوی DNA رخ می‌دهد (اغلب ایجاد قوس یا خمیدگی می‌شود) که امکان تعامل فعال‌کننده با سایر فاکتورها یا با RNA پلیمراز را فراهم می‌سازد. این تعامل سبب تسهیل رونویسی از طریق فراخوانی RNA پلیمراز و سایر فاکتورها برای تشکیل یک کمپلکس شروع می‌شود.

RNA پلیمراز فرایند رونویسی را کاتالیز می‌کند

RNA پلیمرازها ملکول RNA را در جهت '۵ ← '۳ و با استفاده از یک الگوی DNA سنتز می‌کنند. از این نظر، این آنزیم‌ها مشابه DNA پلیمرازهای وابسته به الگویی هستند که در فصل ۴ مورد بحث قرار گرفتند. هر چند برخلاف DNA پلیمرازها، RNA پلیمرازها پلیمریزاسیون را در توالی‌های پروموتری بدون نیاز به پرایمر DNA یا RNA آغاز می‌کنند.

RNA پلیمرازهای پروکاریوتی و اوکاریوتی، آنزیم‌های چند زیرواحدی بزرگی هستند. RNA پلیمراز *Escherichia coli* متشکل از پنج زیرواحد با یک وزن ملکولی تجمعی بیش

1. Activator

از ۵۰۰,۰۰۰ هستند (جدول ۱-۵). دو زیرواحد α، یک زیرواحد β و یک زیرواحد β'، هسته آنزیمی را تشکیل می‌دهند که قادر به رونویسی صادقانه است ولی سنتز RNA توسط آن اختصاصی (یعنی، با شروع از پروموتر) نیست. با افزودن زیرواحد پنجم که با σ نشان داده می‌شود، هولوآنزیمی تولید می‌شود که قادر به سنتز اختصاصی RNA در آزمایشگاه و در داخل سلول است. با وجود این که یک فاکتور اصلی σ در اکثر رونویسی‌ها نقش

جدول ۱-۵ • ترکیب زیرواحدی برخی RNA پلیمرازها[1]

Yeast Pol I	Yeast Pol II	Yeast Pol III	E.coli RNA Polymerase Core
A190	B220(Rpb1)	C160	β'
A135	B150(Rpb2)	C128	β
AC40	B45(Rpb3)	AC40	α
AC19	B12.5(Rpb11)	AC19	ω
ABC23	ABC23(Rpb6)	ABC23	
ABC27	ABC27(Rpb5)	ABC27	
ABC14.5	ABC14.5(Rpb8)	ABC14.5	
ABC10α	ABC10α(Rpb10)	ABC10α	
ABC10β	ABC10β(Rpb12)	ABC10β	
A12.2	B12.6(Rpb9)	C11	
A14	B32(Rpb4)	C17	
A43	B16(Rpb7)	C25	
A49		C37	
A34.5		C53	
		C82	
		C34	
		C31	

[1] زیرواحدهای هُمولوگوس در یک ردیف نشان داده شده‌اند. توجه داشته باشید که پنج زیر واحد بین RNA پلیمرازهای I، II و III مخمر و دو زیرواحد دیگر بین RNA پلیمرازهای I و III مشترک هستند. به علاوه RNA پلیمراز III حاوی سه زیرواحد است که هیچ هُمولوگوس واضحی در سایر پلیمرازها ندارد. احتمال دارد که A49/C37 و A34/C53 هُمولوگوس زیرواحدهای TFIIF باشند؛ TFIIF یک فاکتور شروع و طویل‌سازی است که طی رونویسی مرتبط با RNA پلیمراز II است ولی به‌عنوان جزئی از خود پلیمراز در نظر گرفته نمی‌شود. چهار زیرواحد هر پلیمراز اوکاریوتی هُمولوگوس چهار زیرواحد مختلف هسته RNA پلیمراز از *E.coli* می‌باشند. حروف A، B و C در اسامی زیرواحدی اشاره به وجود آن زیرواحد در به‌ترتیب RNA پلیمراز I، II و III دارد، و عدد موجود در نام زیرواحد اشاره به وزن ملکولی زیرواحد برحسب کیلو دالتون دارد. در مورد RNA پلیمراز II، ژن کدکننده هر کدام از این زیرواحدها در داخل پرانتز آورده شده است.

دارد، فاکتورهای σ اختصاصی در پاسخ به حوادث محیطی و نموی مقیاس - بزرگ[1] ساخته می‌شوند. این فاکتورهای σ، کلاس‌های مختلف ژن‌ها را شناسایی می‌کنند. بدین‌ترتیب یک فاکتور σ اختصاصی پروموترهای مربوط به ژن‌هایی را شناسایی می‌کند که در نتیجه شوک حرارتی القاء می‌شوند. در باکتری‌هایی که در حال ایجاد اسپور هستند، فاکتورهای σ اختصاصی ژن‌هایی را شناسایی می‌کنند که در هنگام اسپورزایی فعال می‌گردند. برخی باکتریوفاژها (ویروس‌هایی که در باکتری‌ها ایجاد عفونت می‌کنند) فاکتورهای σای را سنتز می‌کنند که سبب رونویسی DNA ویروسی توسط RNA پلیمراز سلول میزبان می‌شوند.

RNA پلیمرازهای معمول پروکاریوتی توسط **ریفامپیسین**[2] (مورد استفاده در درمان سل) مهار می‌شوند که به زیرواحد β اتصال می‌یابد (ارتباط بالینی ۱-۵). RNA پلیمرازهای هسته‌ای اوکاریوتی قابل تمایز هستند، زیرا به‌شکل متفاوتی توسط **α-آمانیتین**[3] مهار می‌شوند که خود توسط قارچ سمی *Amanita phalloides* سنتز می‌شود. سه کلاس RNA پلیمراز هسته‌ای را می‌توان تمایز داد، زیرا غلظت‌های بسیار پایین α-آمانیتین مانع سنتز mRNA و برخی ملکول‌های RNA هسته‌ای کوچک[4] (snRNA) می‌شود؛ غلظت بالاتر از سنتز tRNA، 5S rRNA و سایر ملکول‌های snRNA جلوگیری می‌کند. سنتز rRNA (غیر از

ارتباط بالینی ۱-۵

آنتی‌بیوتیک‌ها و سمومی که RNA پلیمراز را هدف می‌گیرند

RNA پلیمراز یک آنزیم ضروری برای حیات است، زیرا رونویسی اولین مرحله بیان ژن است. نبود فعالیت RNA پلیمرازی به معنی آن است که هیچ پروتئینی سنتز نمی‌شود. دو محصول طبیعی این اصل را تشریح می‌کنند؛ در هر دو حالت، مهار RNA پلیمراز منجر به مرگ موجود زنده[1] می‌شود.

فنجان مرگ یا قارچ تله ویرانگر[2]، یعنی *Amanita phalloides* بسیار سمی است و علی‌رغم هشدارهای گسترده به شکارچیان آماتور قارچ‌ها، همچنان در هر سال منجر به مرگ چندین نفر می‌شود (گفته می‌شود در صورت مصرف اتفاقی، خوشمزه است). کشنده‌ترین سم این قارچ، α-آمانیتین می‌باشد که RNA پلیمراز II اوکاریوتی و به‌موجب آن سنتز mRNA را مهار می‌کند. مسمومیت با علائم گوارشی نسبتاً خفیف شروع می‌شود و بعد از ۴۸ ساعت نارسایی کبدی وسیع رخ می‌دهد که به دلیل تجزیه mRNA و پروتئین‌های ضروری آن و عدم جایگزینی توسط ملکول‌های می‌باشد که تازه سنتز شده‌اند. تنها راه درمان از نوع حمایتی، شامل پیوند کبد، می‌باشد.

شکل خوش‌خیم‌تر (حداقل از نظر گونه انسانی)، فعالیت آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین در مهار RNA پلیمرازهای مربوط به انواع مختلف باکتری‌ها، به‌خصوص در درمان سل، می‌باشد. *Mycobacterium tuberculosis* به‌عنوان عامل ایجادکننده سل، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی که به‌طور معمول مصرف می‌شوند، مقاوم است، ولی نسبت به ریفامپیسین حساس می‌باشد که محصولی از یک استرپتومیست خاکی است. از آنجایی‌که RNA پلیمراز پستانداران از انواع پروکاریوتی متفاوت هستند، مهار آنزیم اخیر احتمالاً سمیت زیادی برای میزبان ندارد. این به معنی ایندکس درمانی خوب، یعنی توانایی در درمان یک بیماری بدون ایجاد اثر آسیب‌رسان بر بیمار، برای این دارو است. همگام با بهبود معیارهای بهداشتی، درمان آنتی‌بیوتیکی با ریفامپیسین، و ایزونیازید (یک آنتی‌متابولیت)، مرگ و میر ناشی از سل در کشورهای صنعتی کاهش زیادی را پیدا کرده است. متأسفانه همچنان این بیماری در جمعیت‌های فقیر ایالات متحده و سایر کشورها به صورت آندمی وجود دارد. سل به شکل فعال در تعداد رو به افزایشی از افراد دچار ضعف ایمنی، به‌خصوص بیماران مبتلا به ایدز، دیده می‌شود.

1. Death cap
2. Destroying angle

1. Large-scale 2. Rifampicin 3. α – Amanitin 4. Smal nuclear RNA

سنتز 5S rRNA) حتی با غلظت‌های بسیار بالا نیز توسط این سم مهار نمی‌شود. آنزیم‌های خالص‌شده به شکل متفاوتی توسط α–آمانیتین مهار می‌شوند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که سنتز **mRNA** حاصل عملکرد **RNA** پلیمراز **II** است که حساس‌ترین شکل **RNA** پلیمراز خالص‌شده می‌باشد. سنتز **tRNA**، **5S rRNA**، **U6 snRNA** و سایر ملکول‌های **RNA** کوچک سلولی و ویروسی توسط **RNA** پلیمراز **III** انجام می‌شود. ژن‌های **rRNA** توسط **RNA** پلیمراز **I** رونویسی می‌شوند که در هستک متمرکز می‌باشد. (شماره‌ها اشاره به ترتیب خروج این آنزیم‌ها از ستون‌های کروماتوگرافی دارد.) هر کدام از این آنزیم‌ها یک ساختمان شدیداً پیچیده را دارند (جدول ۱–۵).

یک **RNA** پلیمراز در داخل میتوکندری مسئول سنتز ملکول‌های **mRNA**، **tRNA** و **rRNA** میتوکندریایی است. این آنزیم، همانند **RNA** پلیمراز باکتریایی، توسط ریفامپیسین مهار می‌شود (ارتباط بالینی ۱–۵).

مراحل رونویسی در پروکاریوت‌ها

DNA کروموزومی معمولاً تنها در یک جهت رونویسی می‌شود. رشته **DNA**ای که به‌عنوان الگو برای سنتز **RNA** عمل می‌کند، مکمل رونوشت **RNA** است. به‌طورقراردادی، رشته الگو معمولاً رشته «پایینی» یک **DNA** دو–رشته می‌باشد. جهت رشته دیگر یا رشته غیر الگو یا بالایی وقتی در جهت ′5 به ′3 خوانده می‌شود، همانند جهت رونوشت است؛ این رشته را گاهی رشته کدکننده می‌گویند. وقتی در این کتاب تنها یکی از رشته‌های **DNA** آورده می‌شود، آن رشته کدکننده می‌باشد. با جایگزینی تنها بازهای **U** (اوراسیل) به‌جای **T** (تیمین)، توالی این رشته را می‌توان به رونوشت **RNA** یک ژن تبدیل کرد.

شناسایی پروموتر

رونویسی پروکاریوتی با اتصال **RNA** پلیمراز به یک **پروموتر** ژن آغاز می‌شود (شکل ۲–۵). هولوآنزیم **RNA** پلیمراز به یک طرف **DNA** در فاصله بین حدود **bp** ۴۵ در فرادست و **bp** ۱۰ در فرودست محل شروع رونویسی اتصال می‌یابد. دو قطعه کوتاه در این ناحیه شدیداً حفظ شده می‌باشند (شکل ۱–۵ را ببینید). یکی از این توالی‌ها که در حدود **bp** ۱۰ در فرادست جایگاه شروع وجود دارد، توالی مشترک زیر می‌باشد (گاهی جعبه ۱۰– یا پریبنو[1] نامیده می‌شود):

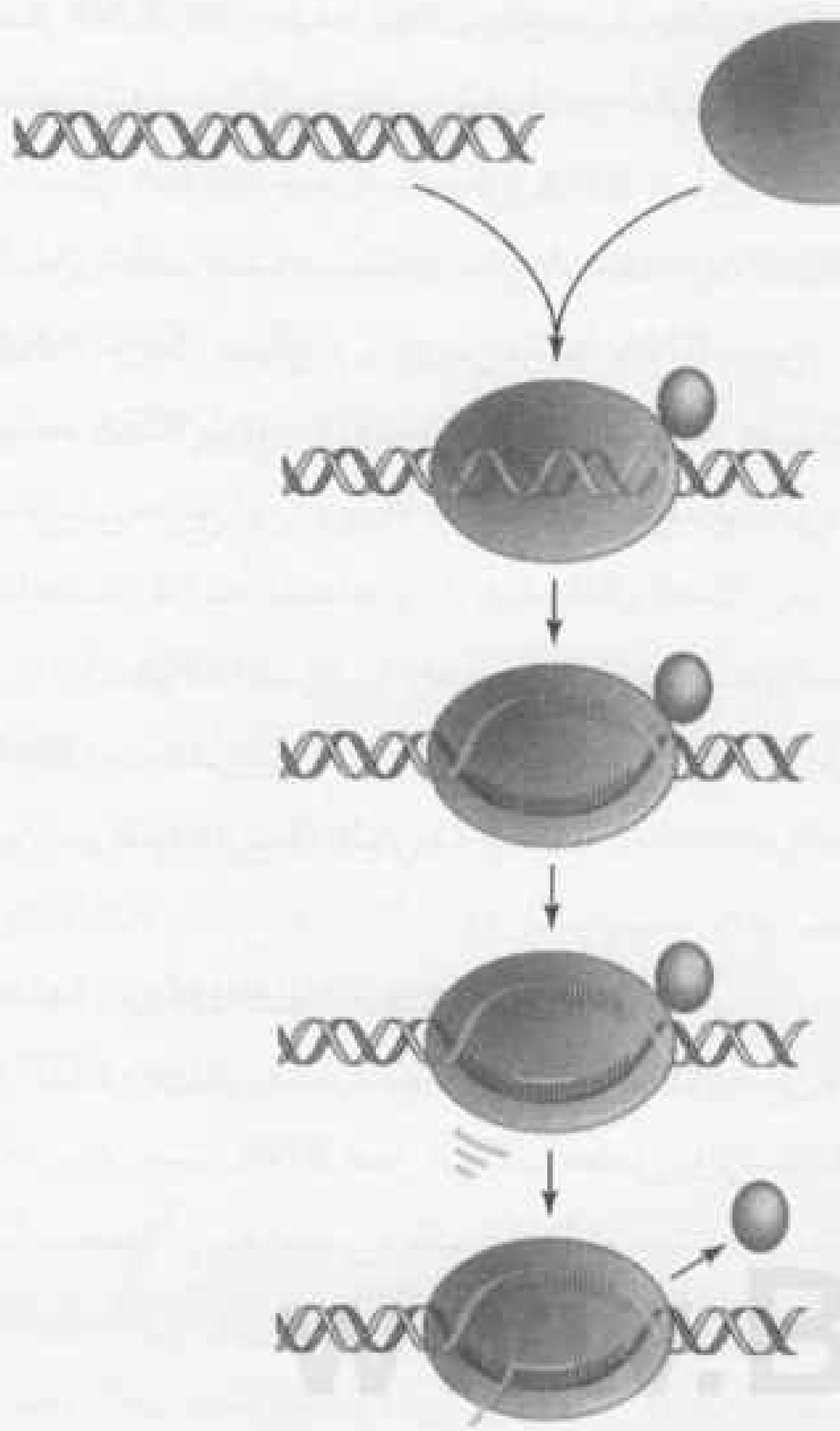
T*A*TAAT*

موقعیت‌هایی که با ستاره نشان داده شده‌اند، حفظ‌شده‌ترین‌ها هستند.

توالی مشترک دوم در فرادست جعبه ۱۰– یا پریبنو قرار دارد. این توالی ۳۵–

T*T*G*ACA

1. Pribnow box



شکل ۲-۵ رخدادهای اولیه در رونویسی پروکاریوتی. DNA حاوی پروموتر به شکل مارپیچ دورشته و RNA پلیمراز باکتری *E.coli* به صورت دو بیضی، بیضی کوچکتر برای اشاره به زیرواحد سیگما و بیضی بزرگتر برای اشاره به هسته پلیمرازی، نشان داده شده‌اند. RNA در حال سنتز در داخل حباب رونویسی و به شکل متصل به DNA الگو و محصولات شروع ناموفق به صورت محصولات آزادشده از کمپلکس شروع نشان داده شده‌اند. با وجود این که این شکل آزادسازی زیرواحد سیگما را در هنگام ورود RNA پلیمراز به وضعیت طویل‌سازی مؤثر را نشان می‌دهد، سرنوشت فاکتور سیگما در این مرحله فرایند رونویسی قدری مورد بحث قرار دارد.

حدود ۳۵ bp در فرادست جایگاه شروع متمرکز می‌باشد؛ فاصله بین این توالی‌های ۳۵- و ۱۰- بسیار مهم است و شامل ۱۷ bp می‌باشد که شدیداً حفظ شده است. توالی‌های TTGACA و TATAAT نامتقارن هستند؛ یعنی، همان توالی را در هنگام خواندن توالی مکمل ندارند. لذا خود پروموتر تعیین می‌کند که رونویسی تنها در یک جهت پیشرفت کند.

این توالی‌های مشترک چه تفاوت‌هایی را برای یک ژن به‌وجود می‌آورند؟ اندازه‌گیری تمایل اتصالی RNA پلیمراز و کارایی شروع رونویسی بر روی توالی‌های پروموتری مختلف نشان می‌دهد که قویترین پروموترها بیشترین تطابق را با توالی‌های مشترک دارند. شدت شباهت یک توالی پروموتری خاص به توالی مشترک، ارتباط خوبی با «قدرت» اندازه‌گیری‌شده یک پروموتر، یعنی توانایی آن در شروع رونویسی با یک RNA پلیمراز خالص‌شده، دارد.

بازهایی که در طرفین توالی‌های ۳۵- و ۱۰- وجود دارند، بازهای موجود در نزدیکی شروع رونویسی، و بازهایی که در نزدیکی موقعیت ۱۶- قرار دارند، به‌خوبی حفظ نشده‌اند. در برخی از این نواحی که به‌طور ضعیف حفظ شده‌اند، RNA پلیمراز ممکن است نیاز به عدم وجود یک نوکلئوتید خاص داشته باشد و یا نیاز به وجود تنوع‌های موضعی در ساختمان مارپیچی DNA داشته باشد. پروموترهای مربوط به ژن‌های شوک حرارتی *E.coli* دارای

توالی‌های مشترک مختلفی در نواحی ۳۵- و ۱۰- هستند. این موضوع با شناسایی آنها توسط فاکتور σ متفاوت سازگار است.

یک رونوشت RNA معمولاً با یک پورین ریبوزید تری‌فسفات، یعنی ...pppG یا ...pppA، آغاز می‌شود، ولی شروع با پیریمیدین نیز مشاهده شده است (شکل ۱-۵ را ببینید). موقعیت شروع رونویسی قدری در بین پروموترها با یکدیگر متفاوت است، ولی معمولاً پنج تا هشت جفت باز در فرودست T نهایی جعبه پریبنو قرار دارد.

شروع سنتز

دو مرحله کینتیکی متفاوت برای شروع سنتز یک رونوشت RNA توسط RNA پلیمراز لازم می‌باشد (شکل ۲-۵ را ببینید). در اولین مرحله که در بالا شرح داده شد، هولوآنزیم RNA پلیمراز به‌طور نسبتاً ضعیفی به DNA پروموتری اتصال می‌یابد و یک کمپلکس بسته را به‌وجود می‌آورد. در مرحله دوم، هولوآنزیم یک کمپلکس باز با اتصال محکم‌تر ایجاد می‌کند که با بازشدن موضعی حدود ۱۰ bp مارپیچ دورشته DNA مشخص می‌شود. جعبه پریبنو غنی از A-T است که بازشدن را می‌تواند تسهیل کند؛ جفت‌بازهای آن راحت‌تر باز می‌شوند. بازشدن ۱۰ bp از DNA از نظر توپولوژیکی معادل شل‌شدن یک ابرفنر منفی است. همان‌طور از این مشاهده می‌توان پیش‌بینی نمود، فعالیت برخی پروموترها وابسته به وضعیت ابرمارپیچی الگوی DNA می‌باشد. برخی پروموترها در DNA شدیداً ابرفنری فعال‌تر هستند، در حالی که پروموترهای دیگر زمانی فعالیت بیشتری دارند که چگالی ابرمارپیچی الگو کمتر باشد. رشته الگوی DNA بازشده با نوکلئوزید تری‌فسفات شروع‌کننده و همچنین با دومین نوکلئوتید زنجیر RNA ایجاد جفت باز می‌کند؛ سپس RNA پلیمراز تولید اولین پیوند فسفودی‌استری را کاتالیز می‌کند. این آنزیم به موقعیت بعدی جابه‌جا شده (این مرحله‌ای است که توسط ریفامپیسین مهار می‌شود) و سنتز را ادامه می‌دهد. بعد از این که چندین نوکلئوتید به زنجیر RNA در حال رشد اضافه شد، آنزیم وارد حالت طویل‌سازی می‌شود که با یک همبستگی بسیار پایدار با الگوی DNA مشخص می‌شود و تا زمان رسیدن به پیام‌های توالی اختصاصی مربوط به خاتمه رونویسی، جدا نمی‌شود. احتمالاً تغییر در همبستگی زیرواحد سیگما با هسته پلیمرازی در ورود به حالت طویل‌سازی شدیداً پیشرونده ارتباط دارد. وقتی RNA پلیمراز از ناحیه پروموتری دور شد، RNA پلیمراز دیگری می‌تواند به پروموتر اتصال یافته و رونویسی را آغاز کند، لذا یک ژن می‌تواند در یک زمان توسط تعداد زیادی پلیمراز رونویسی شود (شکل ۳-۵).



شکل ۳-۵ رونویسی همزمان یک ژن توسط تعداد زیادی RNA پلیمراز که افزایش طول ملکول‌های RNA درحال سنتز را نشان می‌دهد.

طویل‌سازی

RNA پلیمراز چرخه اتصال نوکلئوتید، تشکیل پیوند و جابه‌جایی را با سرعتی در حدود ۴۰ نوکلئوتید در ثانیه ادامه می‌دهد. هرچند، مثال‌های متعدد شناخته‌شده‌ای برای توقف

یا کاهش سرعت RNA پلیمراز در توالی‌های خاص وجود دارد. همان‌طور که در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرد، این محل‌های مکث با خاتمه رونویسی در ارتباط هستند.

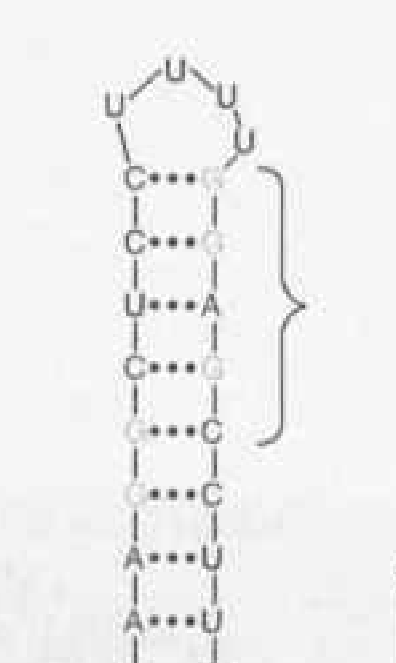
همان‌طور که RNA پلیمراز در طول مارپیچ دورشته حرکت می‌کند، جداسازی دو رشته DNA الگو را ادامه می‌دهد. لذا با یک مکانیسم انتقال اطلاعات (ایجاد جفت باز واتسون-کریک) فرایندهای متعددی انجام می‌شوند: همانندسازی DNA، ترمیم DNA، و رونویسی اطلاعات ژنتیکی به RNA. ایجاد جفت باز همچنین برای ترجمه ضروری است این فرایند بازشدن و دوباره بسته‌شده مارپیچ دورشته DNA منجر به ایجاد تغییراتی در چگالی ابرمارپیچی DNA می‌شود و وضعیت ابرمارپیچی DNA توسط فعالیت DNA توپوایزومرازهای I و II کنترل می‌گردد.

تغییرات کمپلکس رونویسی در طی فاز طویل‌سازی می‌تواند بر روی حوادث بعدی خاتمه تأثیر بگذارد. این تغییرات وابسته به اتصال سایر پروتئین‌های سلولی (برای مثال، پروتئین Nus A) به هسته RNA پلیمراز هستند. ناتوانی در اتصال این فاکتورهای پروتئینی می‌تواند منجر به افزایش فراوانی خاتمه و در نتیجه کاهش میزان بیان ژن گردد.

خاتمه

کمپلکس RNA پلیمراز دو انتهای ژن‌ها را نیز شناسایی می‌کند (شکل ۱-۵). برحسب وابستگی یا عدم وابستگی به فاکتور ρ [1]، خاتمه رونویسی می‌تواند به دو طریق رخ دهد. به همین دلیل خاتمه‌دهنده‌ها به دو نوع **غیروابسته به ρ** و **وابسته به ρ** تقسیم می‌شوند که به‌خوبی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند (شکل ۴-۵). یک توالی نوع- مشترک نقش دارد: یک پالیندروم (تکرار معکوس) غنی از G-C که به دنبال آن ۶ تا ۷ ریشه U در زنجیر RNA وجود دارد. در نتیجه زنجیر RNA یک ساختمان ساقه-و- قوس را درست در فرادست ریشه‌های اولیگو U ایجاد می‌کند. این ساختمان دوم ساقه و قوس برای خاتمه بسیار مهم است، اهمیت این موضوع را می‌توان در تجربیاتی مشاهده نمود که در آنها جهش‌های بازی که مانع ایجاد جفت باز در RNA می‌شوند، خاتمه را نیز کاهش می‌دهند. ساقه و قوسی که بعد از خاتمه باقی می‌ماند، سبب پایداری mRNA پروکاریوتی در برابر تخریب نوکلئولیتیک می‌شود.

خاتمه‌دهنده‌های وابسته به ρ کمتر شناسایی شده‌اند. فاکتور ρ یک پروتئین هگزامری است که یک فعالیت ATPase وابسته به RNA اساسی دارد. توالی‌های مربوط به جایگاه‌های خاتمه وابسته به ρ، توالی‌های غنی از C را به فاصله کوتاهی در فرادست جایگاه خاتمه نشان می‌دهند که به‌جای یک جایگاه اختصاصی، اغلب یک ناحیه نسبتاً وسیع هستند که در آن خاتمه رخ می‌دهد. معتقدند فاکتور ρ با مصرف ATP در طول زنجیر تازه سنتز RNA حرکت کرده تا به RNA پلیمراز در حال طویل‌سازی برسد. در این زمان، ρ به طریقی کمپلکس



شکل ۴-۵ ساختمان ساقه- قوس رونوشت RNA که خاتمه غیروابسته به ρ رونویسی را نشان می‌دهد. به دو جزء ساختمانی توجه کنید: ساقه غنی از C+G و به‌دنبال آن توالی از ریشه‌های U.

1. Rho

طویل‌سازی را ناپایدار نموده و سبب آزادسازی رشته الگوی DNA و زنجیر تکمیل‌شده RNA از یکدیگر و از پلیمراز می‌شود.

ریبوزوم‌های پروکاریوتی معمولاً به mRNA نوظهور در هنگام رونویسی آن متصل می‌شوند. این جفت‌شدن رونویسی و ترجمه در کنترل بیان ژن با مکانیسم تضعیف اهمیت دارد (ص ۴۲۵).

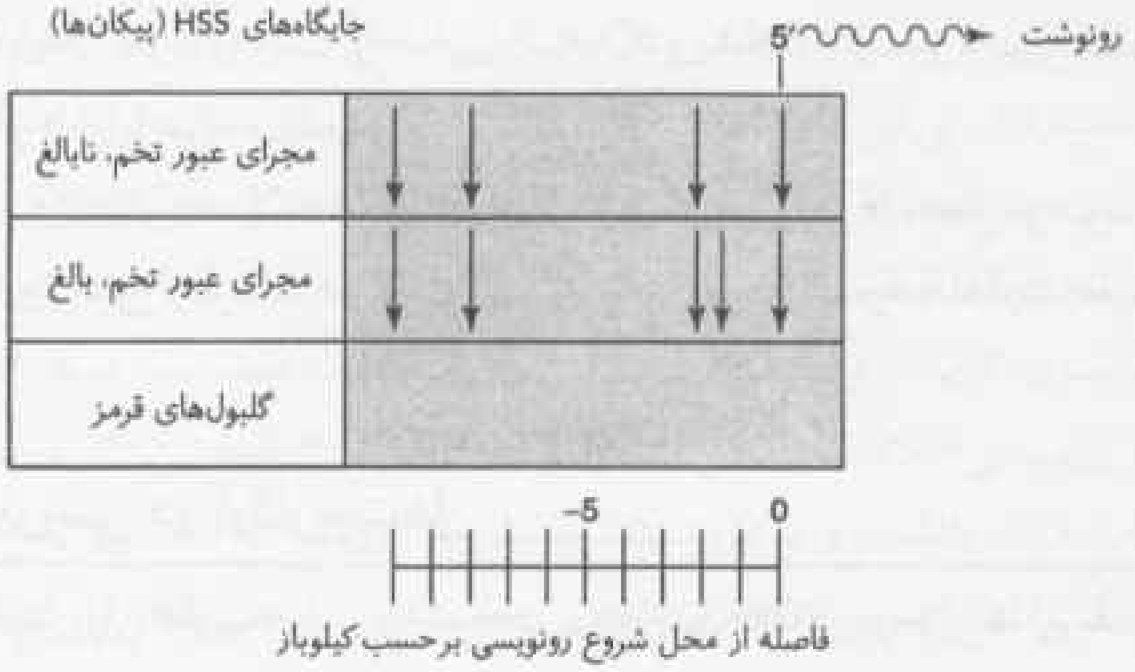
۳-۵ • رونویسی در اوکاریوت‌ها

شروع رونویسی اوکاریوتی تفاوت اساسی با شروع در پروکاریوت‌ها دارد. در حالی‌که تعریف پروموتر مشابه است-توالی از DNA که جایگاه شروع رونویسی را مشخص می‌کند-حوادث ملکولی مورد نیاز برای شروع رونویسی پیچیده‌تر می‌باشند. اول، کروماتین حاوی توالی پروموتری می‌بایست در دسترس ماشین رونویسی قرار گیرد. دوم، فاکتورهای رونویسی مجزا از RNA پلیمراز می‌بایست به توالی‌های DNA موجود در ناحیه پروموتری یک ژن اتصال یابند تا ژن فعال شود. سوم، فاکتورهای پروتئینی دیگر (فعال‌کننده‌ها) به فزاینده‌ها و سایر عناصر کنترل رونویسی عملکرد-سیس اتصال یافته و رونویسی را تحریک می‌کنند.

فاکتورهای رونویسی اوکاریوتی به DNA اتصال یافته و RNA پلیمراز را به پروموتر فرا می‌خوانند. این فرایند برخلاف عمل فاکتورهای σ باکتریایی است که بدون اتصال ابتدایی به هسته آنزیمی RNA پلیمراز، به DNA متصل نمی‌شوند. RNA پلیمراز اوکاریوتی متشکل از سه شکل آنزیمی متفاوت است که هر کدام از آنها قادر به رونویسی کلاس‌های متفاوتی از RNA سلولی هستند. برعکس، تمامی ژن‌های پروکاریوتی توسط یک شکل هسته RNA پلیمرازی رونویسی می‌شوند، هر چند ممکن است نیاز به فاکتورهای σ متفاوتی برای شروع بر روی ژن‌های مختلف باشد.

ماهیت کروماتین فعال

سازماندهی ساختمانی کروموزوم‌های اوکاریوتی در فصول ۴ و ۸ مورد بحث قرار گرفته‌اند. با وجود این که کروماتین بدون توجه به داشتن یا نداشتن قابلیت رونویسی به‌صورت نوکلئوزوم سازماندهی می‌شود، یک ژن فعال عموماً کونفورماسیون «شُل‌تری» نسبت به کروماتین فاقد فعالیت رونویسی دارد. این تفاوت در توالی‌های پروموتری برجسته‌تر می‌باشد که قسمتی از آن اصلاً به صورت نوکلئوزوم سازماندهی نمی‌شود (شکل ۵-۵). نبود ساختمان نوکلئوزومی را می‌توان به‌طور تجربی براساس حساسیت بیشتر توالی‌های پروموتری به معرف‌های خارجی، نظیر آنزیم DNase I، نشان داد که DNA را تجزیه می‌کنند. این افزایش قابلیت دسترسی به توالی‌های پروموتری (تحت عنوان حساسیت زیاد به DNase I)، اتصال فاکتورهای رونویسی به توالی‌های تنظیمی مناسب را تضمین می‌کند. با وجود این که توالی‌های رونویسی-شونده یک ژن ممکن است به صورت نوکلئوزوم سازماندهی شوند، این نوکلئوزوم‌ها اتصال



شکل ۵-۵ جایگاه‌های فوق‌حساس نسبت به DNase (HSS) در فرادست پروموتر برای ژن لیزوزیم جوجه، یک واحد رونویسی شاخص اوکاریوتی. جایگاه‌های فوق‌حساس، یعنی جایگاه‌هایی در اطراف ژن لیزوزیم که در آنها نوکلئوزوم‌ها به DNA اتصال ندارند، با پیکان نشان داده شده‌اند. توجه نمایید که تعدادی جایگاه فوق‌حساس در پروموتر لیزوزیم قرار دارند، در حالی‌که ممکن است مجرای عبور تخم لیزوزیم را سنتز کند یا نکند؛ سنتز لیزوزیم همراه با بازشدن یک جایگاه فوق‌حساس جدید در مجرای عبور تخم بالغ است. برعکس، در گلبول‌های قرمز هسته‌دار که هرگز لیزوزیم نمی‌سازند، هیچ جایگاه فوق‌حساسی مشاهده نمی‌گردد.

سُست‌تری نسبت به انواع موجود در یک ژن غیرفعال دارند. تغییرات کووالان مختلفی در هیستون‌ها همراه با تغییراتی در وضعیت رونویسی ژن‌هایی می‌باشند که به صورت نوکلئوزوم سازماندهی شده‌اند. یکی از این تغییرات که معمولاً همراه با فعال‌سازی رونویسی است، استیلاسیون هیستون‌ها توسط هیستون استیل‌ترانسفرازها می‌باشد؛ این واکنش همراه با انتقال گروه‌های استیل از استیل کوآ به هیستون‌ها، به‌خصوص نواحی انتهای آمینوی هیستون‌های H4 و H3 می‌باشد. تغییرات هیستونی دیگری که بر روی فعالیت ژنی تأثیر می‌گذارند، شامل متیلاسیون، فسفریلاسیون و اوبی‌کوییتیناسیون می‌باشند. متیلاسیون هیستون اغلب همراه با کروماتین غیرفعال است، در حالی که هیستون‌های مربوط به ژن‌های دارای فعالیت رونویسی در معرض تغییرات دیگر قرار دارند. ترکیبی از این تغییرات که در موقعیت‌های اختصاصی مختلفی از هیستون‌ها رخ می‌دهند، ممکن است یک «کد هیستونی» را به وجود آورد که تغییر هیستونی، متراکم‌سازی کروماتین، تغییر DNA و فعالیت ژن را با یکدیگر جفت می‌کند (ارتباط بالینی ۲-۵). یک موضوع کلی این است که برای رونویسی نیاز به کروماتینی می‌باشد که به‌طورنسبی باز شده است، ولی این کافی نیست.

فعال‌سازی رونویسی از طریق فراخوانی RNA پلیمراز انجام می‌شود

فاکتورهای پروتئینی اوکاریوتی، بدون توجه به اینکه به چه چیزی اتصال می‌یابند، به شکل کاملاً متفاوتی نسبت به فاکتور σ در *E.coli* عمل می‌کنند. به جای تشکیل قسمتی از یک کمپلکس پروتئینی و سپس جستجوی توالی DNA مربوطه، این فاکتورها به یک جایگاه (توالی) اختصاصی در DNA اتصال یافته و سپس به RNA پلیمراز (با یا بدون دخالت فاکتورهای واسط) متصل می‌شوند. این مکانیسم را «فراخوانی[1]» گویند که راه جزئی برای فعال‌سازی ژن در پروکاریوت‌ها، ولی یک مکانیسم اصلی در اوکاریوت‌ها است.

1. Recruitment

ارتباط بالینی ۲-۵

سندروم X شکننده: یک بیماری کروماتینی؟

سندروم X شکننده (OMIM ۳۰۰۶۲۴) معمول‌ترین شکل عقب‌ماندگی ذهنی ارثی است که ۱ به ۱۲۵۰ جنس مذکر و ۱ به ۲۰۰۰ جنس مؤنث را مبتلا می‌کند. در نتیجه غیرفعال‌شدن ژن FMR1 که بر روی کروموزوم X قرار دارد و پروتئین FMRP را کد می‌کند، انواع مختلفی از علائم آناتومیکی و نورولوژیکی حاصل می‌شود. ژنتیک این سندروم به دلیل مکانیسم ملکولی جهش X شکننده، پیچیده می‌باشد.

حالت X شکننده از توسعه یک توالی تکراری سه‌نوکلئوتیدی CGG حاصل می‌شود که در ناحیه ترجمه‌نشونده ′5 ژن FRM1 وجود دارد. به‌طور طبیعی، این تکرار به تعداد ۳۰ نسخه وجود دارد، ولی افراد طبیعی می‌توانند تا ۲۰۰ نسخه از این تکرار CGG را داشته باشند. ژنتیک پیچیده بیماری از پتانسیل توسعه توالی تکراری CGG از نسلی به نسل دیگر حاصل می‌شود. وجود تعداد به‌طور غیرطبیعی بالای تکرارهای CGG منجر به القاء متیلاسیون وسیع DNA کل ناحیه پروموتری FMR1 می‌شود. تولید DNA متیله ممکن است با تغییرات هیستونی مرتبط باشد که همراه با کروماتین فاقد فعالیت رونویسی هستند. مطمئناً، DNA شدیداً متیله از نظر رونویسی غیرفعال است و وقتی تکرارهای زیاد CGG منجر به متیلاسیون پروموتر می‌شود، mRNA مربوط به FMRP سنتز نمی‌شود. عدم وجود FMRP این بیماری را به‌وجود می‌آورد.

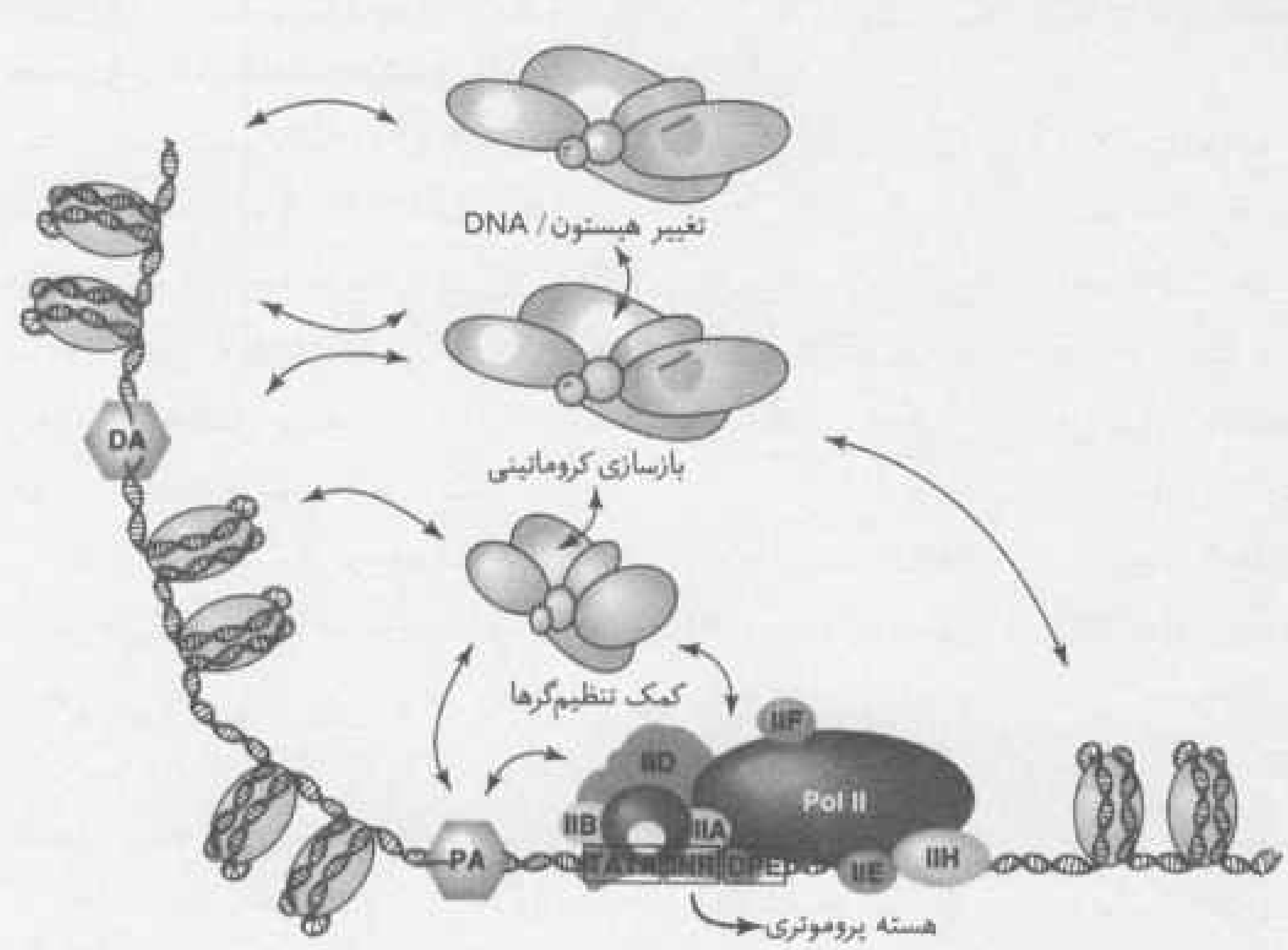
پروتئین FMRP یک پروتئین اتصالی RNA است که به ملکول‌های mRNA پلی‌ریبوزومی سلولی اتصال می‌یابد. اتصال FMRP منجر به تنظیم منفی ترجمه ملکول‌های mRNA هدف، بنابراین کنترل بیان ژن در دندریت، می‌شود. عمل FMRP یکی از مثال‌های متعدد جدیدی است که نشان می‌دهند مکانیسم‌های بعد از ترجمه به چه شکلی بیان ژن و فنوتیپ ملکولی را کنترل می‌کنند.

فزاینده‌ها

فزاینده‌ها میزان رونویسی یک ژن را چندین برابر افزایش می‌دهند. فاکتورهای رونویسی که به فزاینده متصل می‌شوند را فعال‌کننده گویند. پروتئین‌های فعال‌کننده حداقل دو دومن دارند، یکی به توالی فزاینده اتصال می‌یابد و دیگری به فاکتورهای پروتئینی دیگر یا به RNA پلیمراز متصل می‌شود. پذیرفته‌ترین مدل برای این اثرات این است که کروماتین قوسی را به‌وجود می‌آورد که با وجود اینکه فزاینده به فاصله نسبتاً طولانی از پروموتر قرار دارد، این دو را در مجاورت یکدیگر قرار می‌دهد.

رونویسی توسط RNA پلیمراز II

RNA پلیمراز II مسئول سنتز mRNA در هسته است. با بررسی تعداد زیادی ژن، چندین موضوع مشترک مشخص شد. (شکل ۶-۵) (۱) توالی‌های DNA که رونویسی را کنترل می‌کنند، پیچیده هستند؛ یک ژن ممکن است توسط ده‌ها عنصر توالی DNA، غیر از پروموتر، کنترل شود که شامل جایگاه همایش کمپلکس چندپروتئینی حاوی RNA پلیمراز می‌باشند. این کمپلکس قبل‌شروع متشکل از تعدادی فاکتور رونویسی سطح-پایه یا عمومی است (ص ۴۳۸) که در قرارگیری RNA پلیمراز II در جایگاه مناسب برای شروع رونویسی، کمک به جداسازی رشته‌های DNA در جایگاه شروع، و کنترل شروع پلیمراز از حالت شروع تا طویل‌سازی نقش دارد. هرچند، بدون پروتئین‌های کنترل رونویسی دیگر که با فزاینده‌ها و سایر عناصر توالی با عملکرد سیس تعامل می‌کنند، این فرایند عموماً کاملاً غیرموثر است.



شکل ۶-۵ تعامل فاکتورهای رونویسی و فاکتورهای تغییردهنده کروماتین همراه با پروموترهای اوکاریوتی. عناصر کنترل رونویسی با عملکرد سیس که در نزدیکی محل شروع رونویسی قرار دارند، ممکن است شامل یک جعبه TATA، یک عنصر شروع‌کننده (INR)، یا یک عنصر پروموتری فرودست باشند که در اینجا در حالت تعامل با فاکتورهای مرکزی مورد نیاز برای رونویسی اختصاصی توسط RNA پلیمراز II نشان داده شده‌اند. پروموترها معمولاً تنها زیر-مجموعه‌ای از این عناصر، و نه هر سه آنها، را دارند. فاکتورهای مرکزی شامل TFIIA، TFIIB، TFIID، TFIIE، TFIIF، و TFIIH به همراه RNA پلیمراز II می‌باشند. پروتئین‌های فعال‌کننده رونویسی می‌توانند به توالی‌های پروگزیمال-پروموتری (PA) یا دیستال-پروموتر (DA) اتصال یافته و همان‌طور که نشان داده شده است از طریق تعاملاتی با فاکتورهای مرکزی، کمک تنظیم‌گرها یا کمپلکس‌های تغییردهنده کروماتین، رونویسی را فعال کنند. اتصال فاکتورهای مرکزی یا فعالگرهای رونویسی ممکن است لازم بوده یا با تغییراتی در ساختمان کروماتین، نظیر ازدست‌رفتن نوکلئوزوم‌ها، همراه باشد.

عناصر توالی کنترل‌کننده با یکدیگر عمل کرده تا یک الگوی کنترلی ظریف حاصل شود. (۲) اثر توالی‌های کنترل‌کننده بر روی رونویسی به‌واسطه اتصال پروتئین‌ها به هر کدام از این عناصر توالی انجام می‌شود. این فاکتورهای رونویسی توالی نوکلئوتیدی عنصر توالی کنترل‌کننده مناسب را شناسایی می‌کنند. (۳) فاکتورهای رونویسی اتصال‌یافته با یکدیگر تعامل نموده و نهایتاً RNA پلیمراز را فرا می‌خوانند؛ اغلب از طریق فاکتورهای موجود در کمپلکس قبل‌شروع یا سایر ترکیبات واسط عمل می‌کنند. فعالیت‌های اتصال به DNA و فعال‌سازی این فاکتورها در دومن‌های مجزایی از پروتئین‌ها قرار دارند. (۴) RNA پلیمراز II طی واکنش رونویسی تغییر داده می‌شود. سپس این RNA پلیمراز تغییریافته سایر اجزاء هسته‌ای، شامل آنزیم‌های پردازشگر RNA، را طی فاز طویل‌سازی رونویسی فرا می‌خواند.

پروموترهای مربوط به سنتز mRNA

برخلاف RNA پلیمراز پروکاریوتی که تنها یک توالی پروموتری واحد را شناسایی می‌کند، فاکتورهای رونویسی که همراه با RNA پلیمراز II عمل می‌کنند، می‌توانند کلاس‌های متعددی از توالی‌های مشترک فرادست جایگاه شروع mRNA را شناسایی کنند. اولین و برجسته‌ترین این توالی‌ها که **جعبه TATA** نامیده می‌شود، توالی زیر را دارد

TATA (A / T) (A/T) A

که در آن نوکلئوتیدهای موجود در پرانتز می‌توانند A یا T باشند.

جعبه TATA حدود ۲۵ bp در فرادست واحد رونویسی متمرکز می‌باشد. آزمایش‌هایی که همراه با حذف این جعبه بودند، نشان می‌دهند که برای رونوسی مؤثر بسیاری از ژن‌ها وجود آن لازم است، ولی در موارد دیگر تنها ممکن است جایگاه صحیح شروع رونویسی را مشخص کند. برخی پروموترها اصلاً این جعبه را ندارند.

عناصر کنترلی پروگزیمال-پروموتر دیگر اغلب در ژن‌هایی یافت می‌شوند که توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شوند، ولی همگانی نیستند. یکی از این توالی‌ها جعبه CAAT می‌باشد که توالی زیر را دارد:

CG (T / C) CAATCT

توالی‌های دیگری که در شکل ۶-۵ شرح داده شده‌اند نیز ممکن است رونویسی را تسریع کنند.

جعبه‌های CAAT و TATA و همچنین توالی‌های دیگری که در شکل ۶-۵ نشان داده شده‌اند، مستقیماً با RNA پلیمراز II تماس برقرار نمی‌کنند. در عوض، آنها برای فعالیت نیاز به اتصال فاکتورهای رونویسی اختصاصی دارند. توجه داشته باشید که فاکتورهای پروتئینی چطور نه تنها به توالی‌های شناسایی خود، بلکه همچنین به یکدیگر و RNA پلیمراز که خود یک آنزیم بسیار بزرگ و پیچیده است، اتصال می‌یابند. اشکال جهش‌یافته برخی از این فاکتورهای رونویسی محصولاتی از اونکوژن‌ها هستند (ارتباط بالینی ۳-۵).

رونویسی توسط RNA پلیمراز I

ملکول‌های RNA ریبوزومی در یک جسم هسته‌ای اختصاصی به‌نام هستک سنتز می‌شوند و ژن‌های rRNA در یک ناحیه کروموزومی اختصاصی، تحت عنوان سازماندهنده هستکی[1]، قرار دارند. هر واحد رونویسی حاوی توالی‌هایی به ترتیب برای ملکول‌های ۲۸S، ۵٫۸S و ۱۸S rRNA می‌باشد. چند صد نسخه از هر واحد به‌صورت پشت سرهم (یکی بعد از دیگری) در داخل کروموزوم وجود دارد. واحدهای رونویسی توسط توالی‌های فاصله‌انداز[2] از یکدیگر جدا می‌شوند. توالی‌های فاصله‌انداز شامل توالی‌هایی هستند که اتصال **RNA پلیمراز I** و فاکتورهای رونویسی کلاس I را تعیین می‌کنند؛ این فاکتورها فعالیت RNA پلیمراز I را افزایش می‌دهند. شکل ۷-۵ نمایشی از این آرایش می‌باشد. هر کدام از واحدهای تکرای به‌عنوان یک واحد رونویسی شده و تولید رونوشت اولیه‌ای می‌کنند که یک نسخه از هر کدام از توالی‌های ۲۸S، ۵٫۸S و ۱۸S را دارد که سنتز اکی‌مولار این سه ملکول RNA را تضمین می‌کند. سپس رونوشت اولیه توسط ریبونوکلئازها و آنزیم‌های تغییردهنده به سه نوع rRNA بالغ پردازش می‌شود. خاتمه رونویسی در داخل ناحیه فاصله‌انداز رونویسی‌نشونده و قبل از رسیدن **RNA پلیمراز I** به پروموتر واحد تکراری بعدی، رخ می‌دهد. مکانیسم خاتمه متفاوت از چیزی است که قبلاً برای RNA پلیمراز *E.coli* مورد بحث قرار گرفت.

1. Nucleolar organizer
2. Spacer sequences

ارتباط بالینی ۳-۵

نقش فاکتورهای رونویسی در سرطانزایی

برای تبدیل سلولی که به‌خوبی تنظیم می‌شود به یک سلول سرطانی نیاز به‌چندین مرحله مستقل می‌باشد که نتیجه نهایی آنها تولید سلول ترانسفورمه‌ای است که قادر به رشد کنترل‌نشده و متاستاز می‌باشد. شناخت این فرایند حاصل مطالعات DNA نوترکیبی انجام‌شده بر روی ژن‌هایی تحت عنوان اونکوژن‌ها است که محصولات جهش‌یافته یا بیش از حد بیان‌شده آنها با سرطانزایی مرتبط می‌باشد. اونکوژن‌ها برای اولین بار به‌عنوان اجزاء ژنوم DNA و RNA ویروس‌های توموری شناسایی شدند، ولی آنهایی‌که در RNA ویروس‌های توموری یافت می‌شوند، از ژن‌هایی مشتق شده‌اند که در سلول‌های طبیعی وجود دارند. آنالوگ‌های طبیعی جهش‌نیافته سلولی اونکوژن‌ها را پروتواونکوژن گویند. این محصولات اجزاء بسیاری از مسیرهایی هستند که رشد و تمایز سلول طبیعی را تنظیم می‌کنند. جهش به شکل اونکوژنیک مستلزم تغییری است که پاسخ‌دهی محصول تنظیمی تولیدی به کنترل طبیعی را کمتر می‌کند.

برخی محصولات پروتواونکوژنی در هدایت پیام‌های هورمونی یا شناسایی فاکتورهای رشد سلولی نقش دارند و در داخل سیتوپلاسم فعالیت می‌کنند. سایر پروتواونکوژن‌ها در هسته فعالیت دارند؛ محصول ژنی اینها اغلب مرتبط با دستگاه رونویسی می‌باشند و در پاسخ به محرک‌های رشد سنتز می‌شوند. تصور این موضوع ساده است که چطور تولید بیش از حد یا فعال‌سازی دائمی چنین فاکتور رونویسی مثبتی می‌تواند به ترانسفورماسیون یک سلول به بدخیمی کمک کند: ژن‌هایی که به‌طور طبیعی در یک سطح پایین و کنترل‌شده‌ای بیان می‌شوند، با چنین مکانیسم کنترلی مختل شده‌ای بیش از حد بیان خواهند شد.

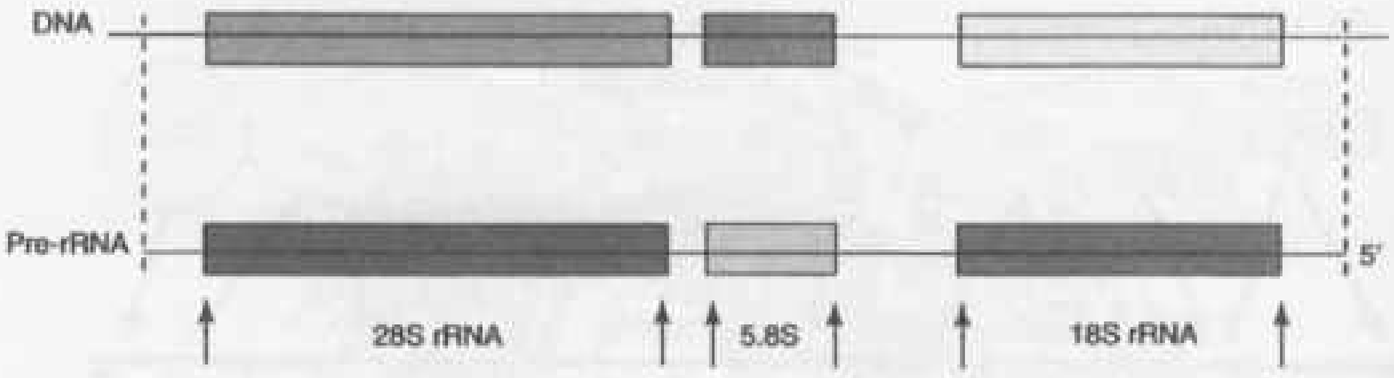
نمونه دیگر اثر ژنتیکی ظریف‌تر در افزایش استعداد به سرطان، پروتئین فرونشاننده توموری p53 انسانی است. این پروتئین محصول عضوی از کلاس دیگر ژن‌های درگیر در تومورزایی، یعنی ژن‌های فرونشاننده تومور، می‌باشد. برعکس اونکوژن‌ها که محصولات آنها رشد و تقسیم سلولی را به‌طور مثبت کنترل می‌کنند، محصول یک ژن فرونشاننده تومور، همانند p53، اثر تنظیمی منفی بر تقسیم سلولی دارد. یک نسخه از ژن جهش‌یافته p53 منجر به سندروم لی-فرامنی[1] می‌شود که حالت ارثی افزایش استعداد به کارسینوم‌های پستان و کورتکس آدرنال، سارکوم‌ها، لوسمی‌ها و تومورهای مغزی است.

جهش‌های پیکری در p53 را می‌توان در حدود نیمی از سرطان‌های انسانی شناسایی نمود. این جهش‌ها که عملکرد را از بین می‌برند، یا بر روی پایداری و یا بر روی توانایی p53 در اتصال به DNA تأثیر می‌گذارند. پروتئین نوع وحشی به کنترل نقطه وارسی بین فازهای G1 و S چرخه سلولی کمک کرده، ترمیم DNA را فعال می‌سازد، و در موارد دیگر، منجر به مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) می‌شود. بنابراین، فعالیت‌های بیوشیمیایی p53 در جهت حفظ تنظیم رشد سلولی، حفظ محتوای اطلاعاتی ژنوم، و نهایتاً، حذف سلول‌های آسیب‌دیده عمل می‌کنند. تمامی این فعالیت‌ها با ترانسفورماسیون نئوپلاستیک یک سلول مخالفت می‌کنند.

این نقش‌های متنوع حاصل فعالیت p53 به‌عنوان یک فاکتور رونویسی است که برخی ژن‌ها را مهار نموده و ژن‌های دیگر را فعال می‌کند. برای مثال، p53 یک پروتئین اتصالی به جایگاه اختصاصی در DNA است و رونویسی برخی ژن‌ها، شامل انواع درگیر در ترمیم DNA، را افزایش می‌دهد. ساختمان سه-بُعدی p53 تعیین شده است. جهش‌های یافت‌شده در p53 تومورهایی را تولید می‌کنند که بر روی دومن اتصال به DNA پروتئین تأثیر می‌گذارند. برای مثال، تقریباً ۲۰٪ تمامی ریشه‌های جهش‌یافته مستلزم جهش‌هایی در دو موقعیت p53 هستند. ساختمان کریستالی کمپلکس پروتئین-DNA نشان می‌دهد که این دو اسید آمینه که هر دو آرژنین هستند، پیوندهای هیدروژنی را با DNA برقرار می‌کنند. آرژنین ۲۴۸ پیوندهای هیدروژنی را در شیار کوچک مارپیچ DNA با یک اتم اکسیژن تیمین و با یک اتم نیتروژن آدنین برقرار می‌کند. جهش سبب اختلال در ایجاد این شبکه پیوندهای هیدروژنی شده و بنابراین توانایی p53 در تنظیم رونویسی را مختل می‌سازد.

1. Li-Fraumeni syndrome

پروموتری که توسط RNA پلیمراز I شناسایی می‌شود، در داخل فاصله‌انداز رونویسی نشونده، از موقعیت ۴۰- تا ۱۰+ و از ۱۵۰- تا ۱۱۰- قرار دارد. یک فاکتور رونویسی به این پروموتر اتصال یافته و به موجب آن شناسایی توالی پروموتری توسط RNA پلیمراز I را



شکل ۷-۵ ساختمان یک واحد رونویسی. ژن‌های RNA ریبوزومی با تعداد زیادی نسخه یکی پس از دیگری آرایش یافته‌اند. هر نسخه به‌طور مجزا رونویسی شده و هر رونوشت به سه نوع RNA متفاوت پردازش می‌شود. توالی‌های پروموتری و فزاینده در نواحی رونویسی‌نشونده این توالی‌های تکراری پشت‌سرهم قرار دارند.

هدایت می‌کند. به‌علاوه، یک عنصر فزاینده حدوداً ۲۵۰ bp در فرادست پروموتر در DNA ریبوزومی انسان قرار دارد. اندازه فاصله‌انداز رونویسی‌نشونده و همچنین موقعیت عنصر فزاینده، به‌میزان قابل توجهی در بین موجودات متفاوت است.

رونویسی rRNA می‌تواند بسیار سریع باشد؛ این موضوع انعکاسی از این واقعیت است که سنتز ریبوزوم‌ها مرحله محدودکننده سرعت برای رشد سلولی است و به‌همین دلیل تقاضا برای rRNA می‌تواند بسیار بالا باشد. در حالات دیگر، وقتی رشد زیاد سریع نیست، تنها چند تکرار rDNA از نظر رونویسی فعال است.

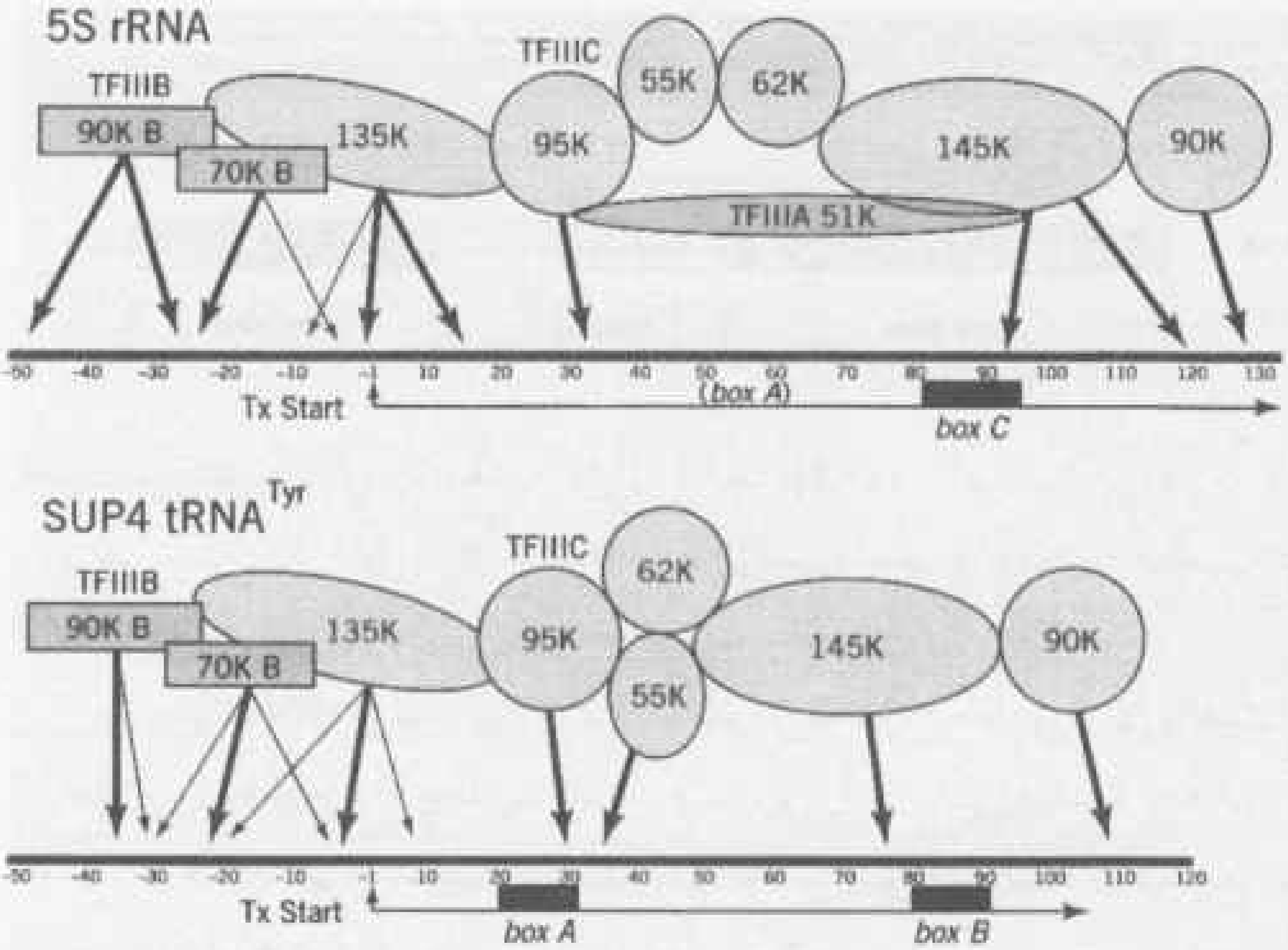
رونویسی توسط RNA پلیمراز III

بسیاری از موضوعاتی که در بالا برای رونویسی از پروموترهای کلاس I و کلاس II مورد اشاره قرار گرفتند، برای سنتز 5S RNA، tRNA و سایر ملکول‌های RNA کوچک سلولی و ویروسی توسط **RNA پلیمراز III** نیز صادق هستند. فاکتورهای رونویسی به DNA اتصال یافته و فعالیت RNA پلیمراز را هدایت می‌کنند. یکی از خصوصیات غیرمعمول فعالیت RNA پلیمراز III، موقعیت توالی‌های اتصالی فاکتور رونویسی است؛ این توالی‌ها می‌توانند در داخل توالی DNA کدکننده RNA قرار داشته باشند و اغلب به‌عنوان ناحیه کنترلی داخلی[1] مورد اشاره قرار می‌گیرند. در برخی موارد، توالی DNAای که بلافاصله در ناحیه ′5 ناحیه رونویسی ژن قرار دارد را می‌توان با اثرات نسبتاً کم بر روی رونویسی، با توالی‌های دیگر جایگزین نمود. هر چند در موارد دیگر، توالی‌های فرادست جایگاه شروع رونویسی می‌تواند نقش مهمی در تعیین کارایی رونویسی داشته باشد. به‌نظر می‌رسد این تفاوت‌ها از اهمیت نسبی تماس‌های مختلف DNA–پروتئین در تثبیت کل کمپلکس رونویسی متشکل از چندین پروتئین و همچنین RNA پلیمراز III حاصل شوند. در شکل ۸-۵، ارتباطات موجود در بین این پروتئین‌های مختلف و توالی DNA زمینه‌ای برای ژن rRNA 5S و یک ژن tRNA نشان داده شده است.

اساس آنزیمی مشترک برای عمل RNA پلیمراز

در سال‌های اخیر به‌واسطه تعیین ساختمان‌های سه بُعدی یک فاکتور σ، یک هسته RNA پلیمرازی باکتریایی، هولوآنزیم RNA پلیمراز، یک RNA پلیمراز II اوکاریوتی و حتی یک

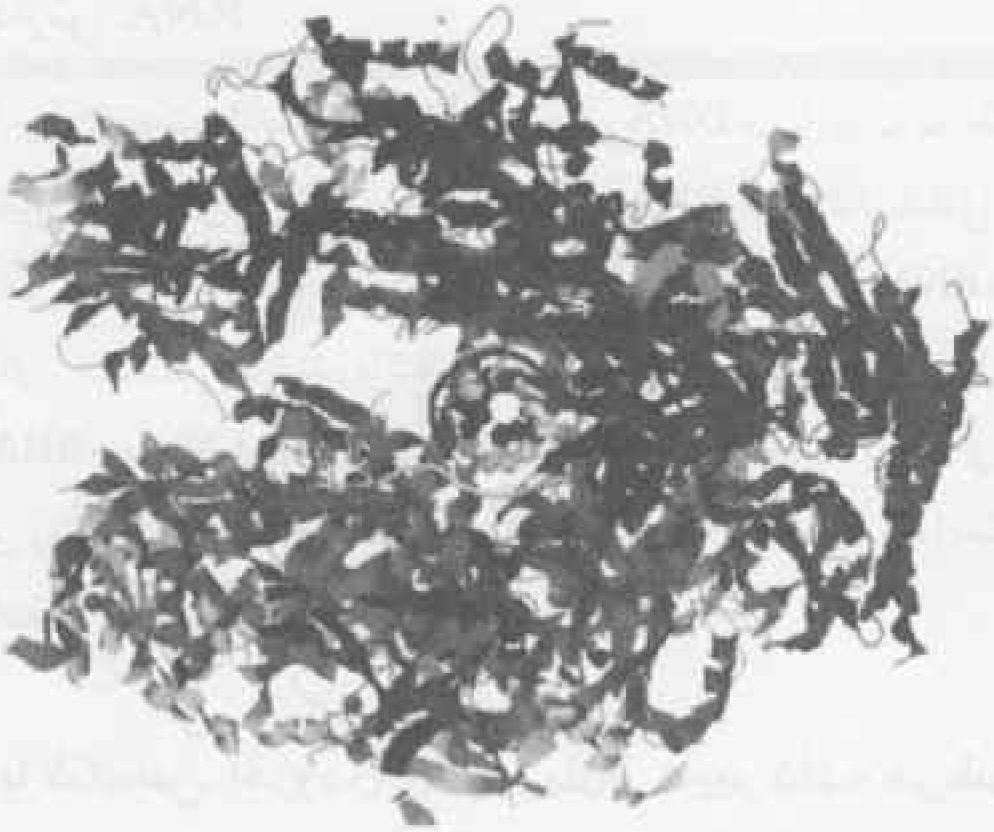
1. Internal control region



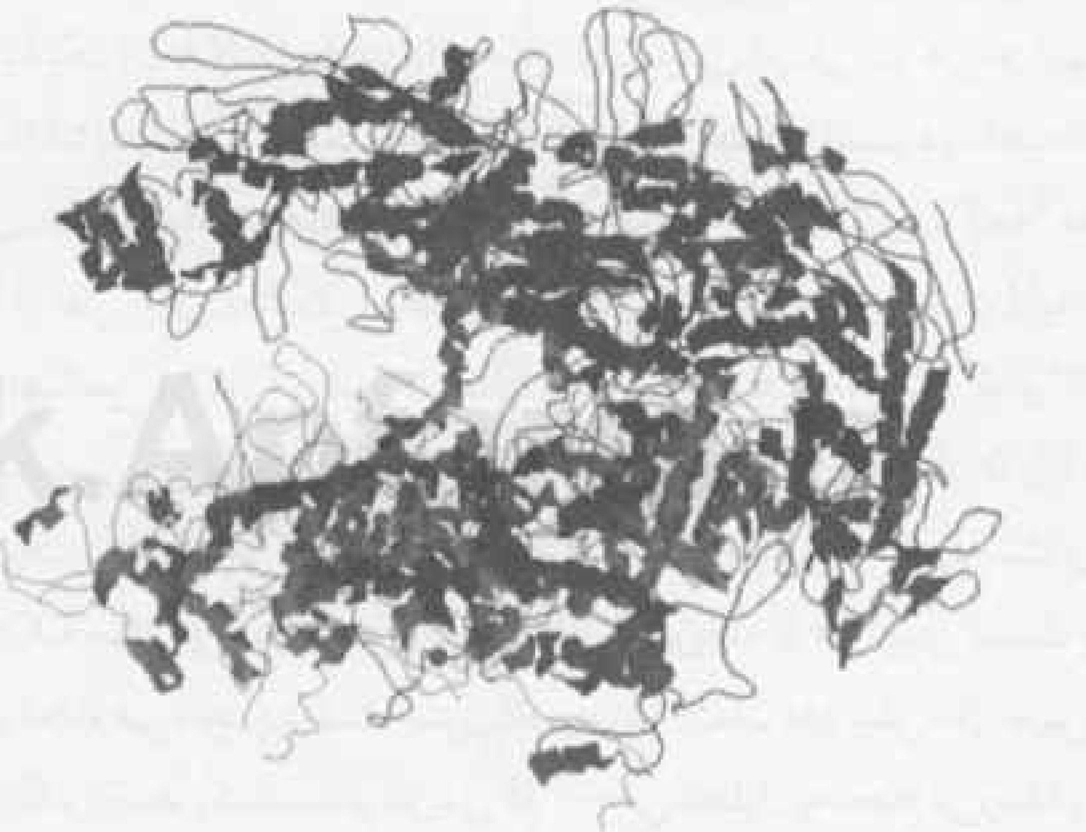
شکل ۸-۵ توالی‌های مربوط به رشته‌های غیرالگوی ژن‌های مخمری کدکننده 5S rRNA و یک tRNA همراه با نمایش‌های شماتیکی از زیرواحدهای مختلف TFIIA، TFIIB و TFIIC نشان داده شده‌اند. موقعیت‌های نسبی این زیرواحدها نسبت به توالی‌های DNA دو ژن با پیکان نشان داده شده‌اند. توجه داشته باشید که TFIIIA برای تولید یک کمپلکس رونویسی بر روی ژن‌های 5S rRNA، ولی نه ژن‌های tRNA، مورد نیاز است. TFIIIA مسئول قسمت بیشتر شناسایی توالی-اختصاصی ناحیه کنترل داخلی ژن 5S rRNA می‌باشد، در حالی‌که TFIIIC این کار را برای ژن tRNA انجام می‌دهد. با این وجود، هر دو فاکتور TFIIIC و TFIIIB برای رونویسی هر دو ژن 5S rRNA و tRNA مورد نیاز هستند.

RNA پلیمراز II مشغول طویل‌سازی رونویسی به‌طریق کریستالوگرافی اشعه-X، شناخت ما از اساس ملکولی فعالیت RNA پلیمراز افزایش یافته است. برخلاف تمامی تفاوت‌های موجود در ترکیب زیرواحدی، اندازه و مکانیسم، به‌نظر می‌رسد RNA پلیمرازها به طریق مشابهی با الگوهای DNA خود، سوبستراهای نوکلئوتیدی و زنجیرهای RNA در حال سنتز تعامل می‌کنند.

به شکل قابل توجهی، اشکال آنزیم‌های پروکاریوتی و اوکاریوتی، به‌خصوص در هسته کاتالیتیکی آنزیم‌ها، مشابه هستند. هم هسته RNA پلیمراز باکتریایی و هم RNA پلیمراز II مخمر تقریباً شکلی همانند چنگال خرچنگ دارند (شکل ۹-۵). DNA از یک انتها وارد پلیمراز شده و از میان یک شکاف عمیق در این آنزیم عبور می‌کند تا این که با ایجاد یک خمیدگی ۹۰ درجه از پلیمراز خارج گردد. جایگاه کاتالیتیک که محل افزودن نوکلئوتید جدید به انتهای ′۳ زنجیر در حال رشد RNA است، در انتهای این کانال قرار دارد. دو رشته از ملکول DNA مارپیچی دورشته توسط این آنزیم از یکدیگر جدا شده تا یک «حباب رونویسی» و یک جفت‌باز نُه‌تایی موقتی RNA-DNA را در داخل این حباب بوجود آورد. نوکلئوتیدها وارد آنزیم شده و RNA از میان دو کانال مجزای دیگر موجود در این ملکول خارج می‌شود. برخلاف تفاوت‌های موجود در توالی و ترکیب زیرواحدی، RNA پلیمرازهای پروکاریوتی و اوکاریوتی ساختمان‌های مشابهی را برای انجام اهداف مشابه در جهت سنتز یک زنجیر RNA جدید حفظ کرده‌اند. اینها عبارتند از (۱) عبور الگوی DNA از میان کانالی در آنزیم، (۲) جداسازی رشته‌ها در جهت تولید یک حباب DNA که در داخل آن یک هیبرید RNA-DNA وجود دارد که انتهای ′۳ زنجیر RNA در جایگاه فعال قرار گرفته است، (۳) آوردن نوکلئوتیدها به داخل جایگاه فعال از میان یک منفذ موجود در آنزیم،



(a)



(b)

شکل ۹-۵ مقایسه ساختمان‌های مربوط به RNA پلیمرازهای اوکاریوتی و پروکاریوتی. از رنگ‌های یکسانی برای زیرواحدهای هُمولوگوس موجود در این دو آنزیم استفاده شده است. به شباهت موجود در اشکال کلی توجه کنید. (a) ساختمان سه-بُعدی RNA پلیمراز II مخمر در مرحله طویل‌سازی رونویسی به‌کار گرفته شده است. زیرواحدهای مختلف با رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند که در آن بزرگترین زیرواحد رنگ آبی و دومین زیرواحد بزرگ رنگ سبز دارد. رشته الگوی DNA زرد و RNA در حال سنتز آبی تیره است. این ساختمان دو زیرواحد RNA پلیمراز (محصول ژن‌های Rpb4 و Rpb7) را از دست داده است و رشته غیرالگوی DNA در تعیین اجزاء این ساختمان تفکیک نشده است. (b) ساختمان هسته RNA پلیمراز از Thermus aquaticus در پایین نشان داده شده است. زیرواحد β' با رنگ سبز، زیرواحد β با رنگ آبی، دو زیرواحد α با رنگ قرمز و زیرواحد ω با رنگ بنفش نشان داده شده است.

(۴) استفاده از یون فلزی برای کمک به کاتالیز تشکیل یک استر فسفات جدید بین فسفات آلفا نوکلئوزید تری‌فسفات ورودی و انتهای $3'$ زنجیر RNA در حال سنتز، (۵) خارج نمودن محصول RNA از میان یک منفذ دیگر، و (۶) هدایت ایجاد مارپیچ دورشته DNA بعد از خروج این رشته‌ها از آنزیم.

بیاد دارید که زیرواحد σ هولوآنزیم پروکاریوتی مسئول اتصال به جعبه‌های ۱۰- و ۳۵- پروموتر است. مطالعات ساختمانی نشان داده‌اند که سیگما یک ملکول دوک‌مانند متشکل از یک دسته ریشه‌های مارپیچی α می‌باشد که به شکل یک V باز متراکم شده‌اند. یک بازوی این «V» حاوی ریشه‌های مهمی برای شناسایی پروموتر و اتصال هسته پلیمرازی است. یک طرف این بازو حاوی یک مارپیچ α است که به توالی ۱۰- اتصال یافته و سمت دیگر از طریق تعاملات آبگریز به هسته پلیمرازی متصل می‌باشد.

۴-۵ • پردازش RNA

در پروکاریوت‌ها و اوکاریوت‌ها، نسخ RNA توالی‌های DNA می‌بایست به ملکول‌های بالغ وظیفه‌دار تغییر داده شوند. واکنش‌های پردازش RNA می‌توانند شامل برداشت نوکلئوتیدهای اضافی، تغییر بازی، افزودن نوکلئوتیدها، و جداسازی توالی‌های RNA مختلف با فعالیت نوکلئازهای اختصاصی باشند. واکنش‌های پردازشی می‌توانند همزمان با رونویسی (در هنگامی که RNA همچنان در حال سنتز توسط RNA پلیمراز است) یا بعد از رونویسی (بعد از آزادسازی رونوشت توسط RNA پلیمراز) انجام شوند. بالاخره، ملکول‌های RNA به خارج هسته انتقال داده می‌شوند.

RNA انتقالی با شکستن، افزودن و تغییر بازی، تغییر داده می‌شود

شکستن

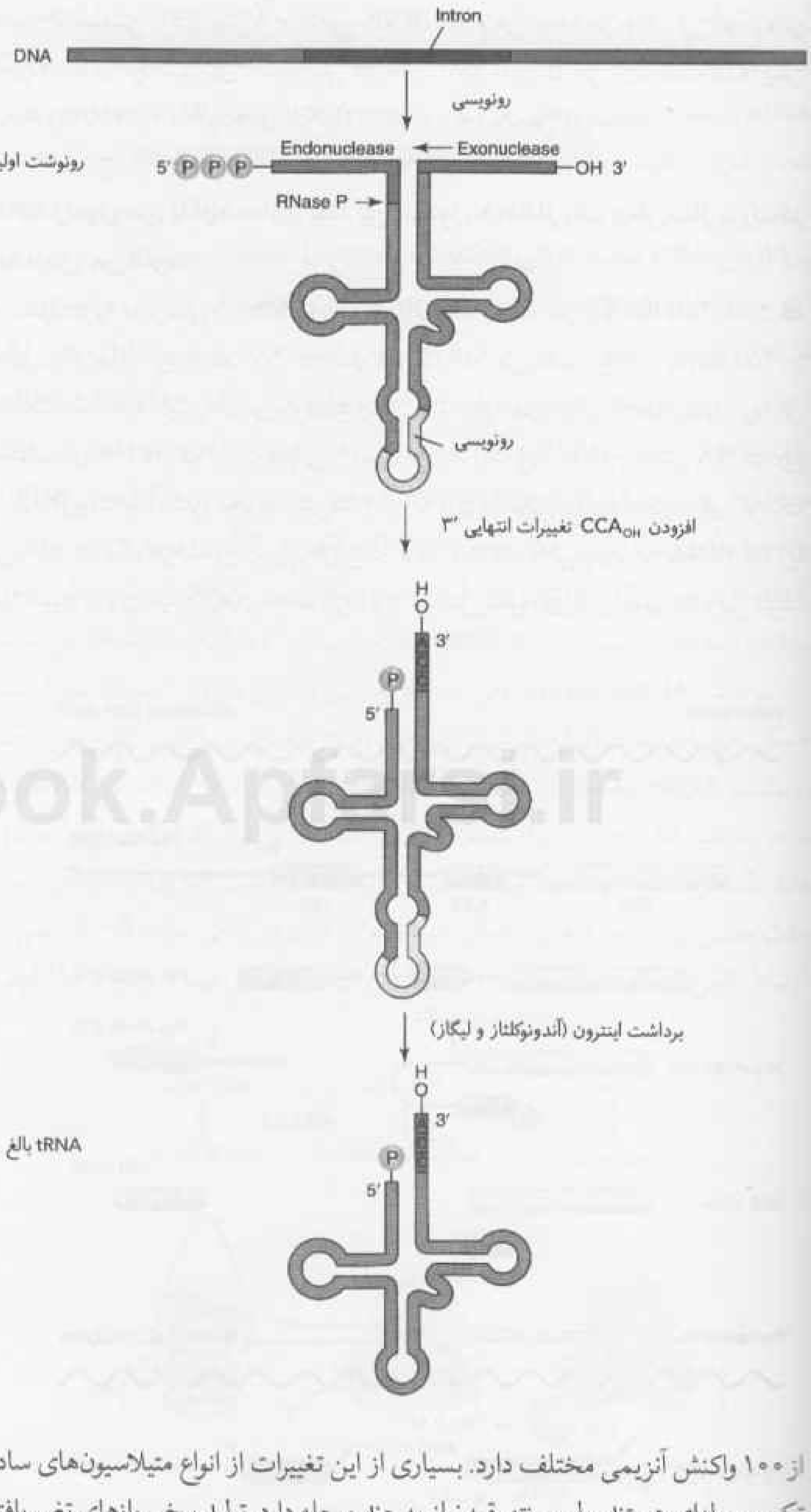
رونوشت اولیه یک ژن tRNA حاوی توالی‌های نوکلئوتیدی اضافی در هر دو انتهای ′۵ و ′۳ توالی tRNA است. این رونوشت‌های اولیه همچنین ممکن است در ناحیه آنتی‌کدون حاوی اینترون باشند. واکنش‌های پردازش بعد از ترجمه با یک ترتیب کاملاً مشخص، ولی نه لزوماً از نظر زمانی به‌شکل سختگیرانه، انجام می‌شود. ابتدا رونوشت اولیه به طریق نسبتاً غیراختصاصی آرایش می‌شود تا ملکول پیش‌سازی با امتدادهای ′۵ و ′۳ کوتاه‌تر حاصل شوند. سپس ریبونوکلئاز P که یک ریبوزیم است (ص ۹۷)، امتداد ′۵ را با شکست آندونوکلئولیتیک برداشت می‌کند. انتهای ′۳ به طریق اگزونوکلئولیتیک برداشت و به‌دنبال آن انتهای CCA سنتز می‌شود. سنتز نوکلئوتیدهای تغییریافته با هر ترتیبی نسبت به آرایش نوکلئولیتیک انجام می‌شود. برداشت اینترون توسط ساختمان دوم پیش‌ساز تعیین می‌شود (شکل ۱۰-۵) و توسط یک سیستم آنزیمی دو-جزئی محلول به انجام می‌رسد؛ یک آنزیم اینترون را بر می‌دارد و دیگری دوباره زنجیر نوکلئوتیدی را می‌دوزد.

افزودن انتهای ′۳

هر ملکول وظیفه‌دار tRNA در انتهای ′۳ خود توالی CCA را دارد. این توالی برای tRNA جهت قبول اسیدهای آمینه ضروری است. در اکثر موارد این توالی به‌طور متوالی توسط آنزیم tRNA نوکلئوتیدیل ترانسفراز اضافه می‌گردد. نوکلئوتیدیل ترانسفراز از ATP و CTP به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند و همیشه آنها را با نسبت 2C/1A به tRNA اضافه می‌کند. انتهای CCA در هر دو نوع tRNA سیتوزولی و میتوکندریایی یافت می‌شود.

نوکلئوزیدهای تغییریافته

نوکلئوتیدهای RNA انتقالی بیشترین میزان تغییرات را در تمامی ملکول‌های اسید نوکلئیک دارند. بیش از ۶۰ تغییر مختلف در بازها و ریبوز tRNA یافت شده است که نیاز به بیشتر



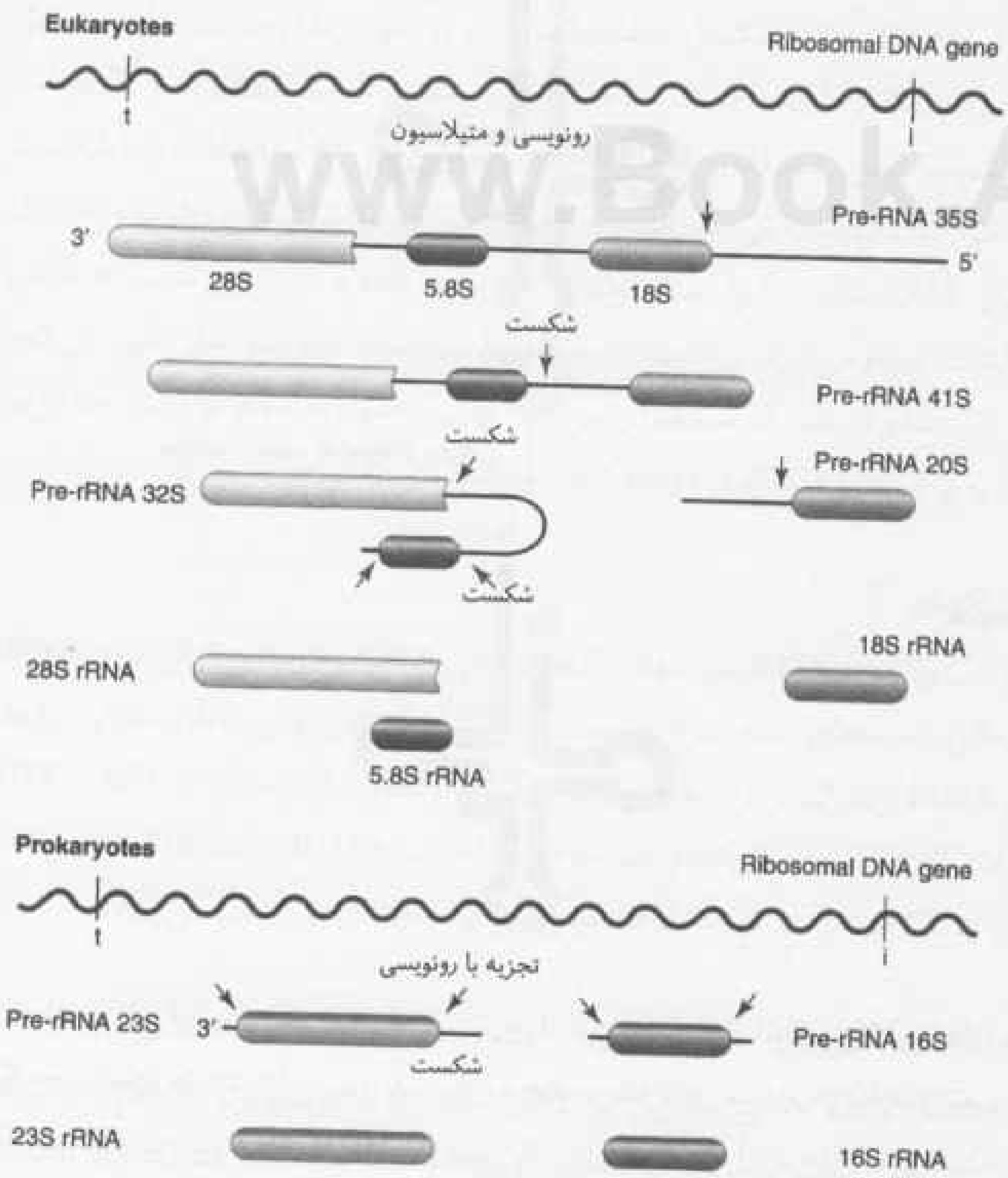
شکل ۱۰-۵ طرحی از پردازش یک tRNA اوکاریوتی. رونوشت اولیه توسط RNase P و یک '۳ اگزونوکلئاز شکسته شده و در صورت لزوم قبل از برداشت اینترون، CCA انتهایی توسط tRNA نوکلئوتیدیل سنتاز سنتز می‌گردد.

از ۱۰۰ واکنش آنزیمی مختلف دارد. بسیاری از این تغییرات از انواع متیلاسیون‌های ساده تک-مرحله‌ای هستند، ولی سنتز بقیه نیاز به چند مرحله دارد. تولید برخی بازهای تغییریافته نیازمند شکستن پیوند β-گلیکوزیدی بین باز و ریبوز است. آنزیم‌های تغییردهنده، یک

تغییر اختصاصی را در بیش از یک نوع tRNA انجام می‌دهند؛ هر چند، این آنزیم‌های تغییردهنده در موقعیت‌های اختصاصی قرار دارند. اکثر تغییرات قبل از شکسته‌شدن پیش سازهای tRNA به ملکول‌های tRNA با اندازه بالغ، تکمیل می‌شوند.

RNA ریبوزومی با آزادسازی چندین ملکول RNA از یک پیش‌ساز بزرگ‌تر پردازش می‌شود

محصول اولیه رونویسی ژن tRNA یک RNA بلند، تحت عنوان ۴۵S RNA، است که حاوی توالی‌های مربوط به ۲۸S، ۵٫۸S و ۱۸S rRNA می‌باشد. پردازش ۴۵S RNA در هستک و توسط همایش‌های ریبونوکلئوپروتئینی چند زیرواحدی بزرگی انجام می‌شود. پردازش ملکول‌های rRNA یک ترتیب متوالی را دنبال می‌کند (شکل ۱۱-۵). پردازش pre-rRNA در پروکاریوت‌ها مستلزم تجزیه پیش‌سازهای با وزن ملکولی بالا به ملکول‌های کوچک می‌باشد. در یک مرحله زودرس پردازش در اوکاریوت‌ها، برخی بازها در ۳۵S rRNA با متیلاسیون بر روی نیتروژن‌های حلقه بازها و با تشکیل پسودواوریدین تغییر داده می‌شوند.



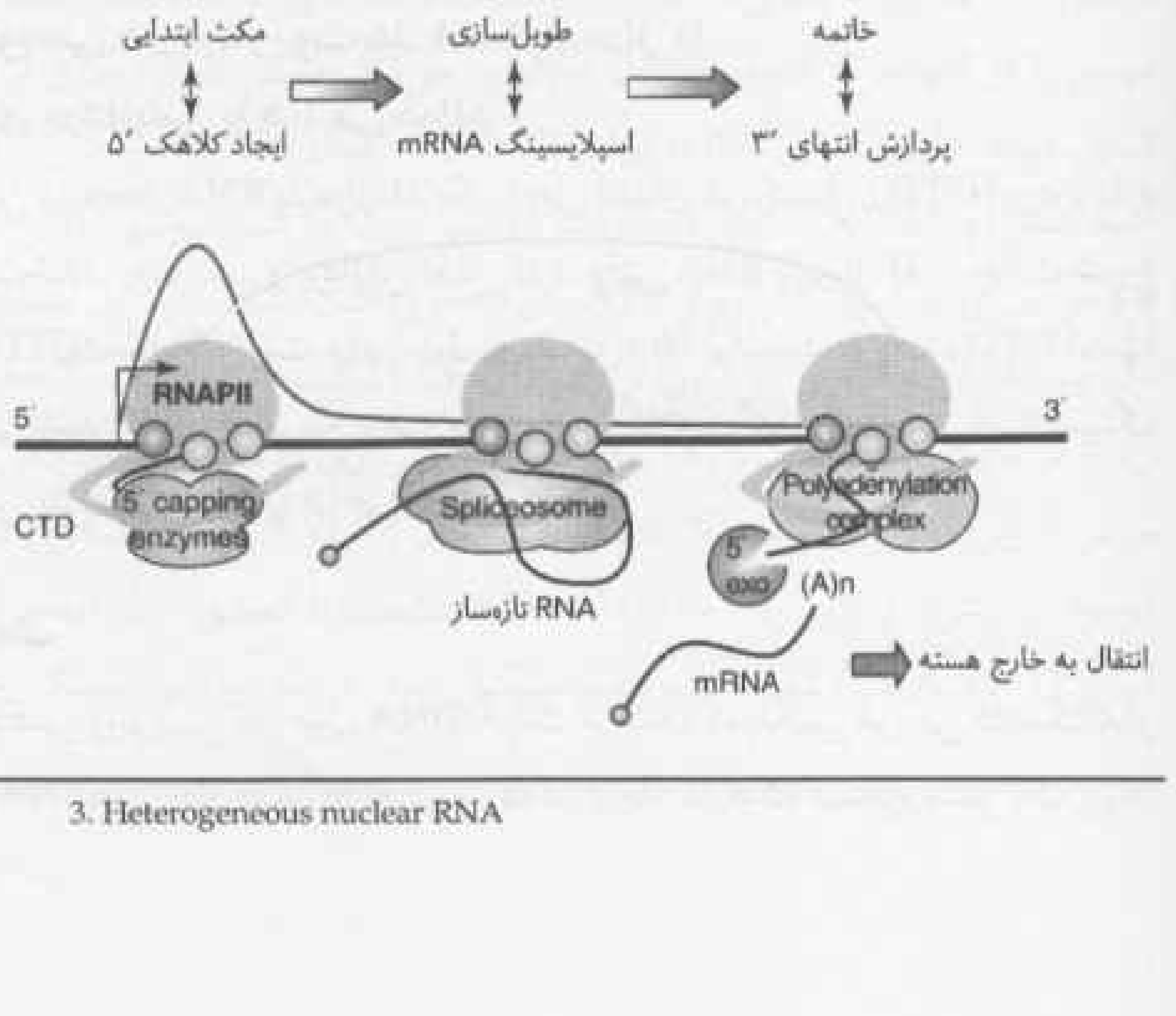
شکل ۱۱-۵ طرح‌هایی برای رونویسی و پردازش ملکول‌های rRNA.

این واکنش‌ها توسط ذرات ریبونوکلئوپروتئینی هستکی کوچک[1] (snoRNP) موجود در هستک انجام می‌شوند. هر snoRNP حاوی یک **RNA راهنما**[2] است که با ایجاد جفت باز با رونوشت rRNA در محل تغییر، مشخص می‌کند در چه محلی متیلاسیون یا تشکیل پسودواوریدین انجام شود. مکانیسم مشابهی در تغییر برخی ملکول‌های کوچک RNA رخ می‌دهد.

پردازش RNA پیک، توالی کدکننده صحیح را تضمین می‌کند

اکثر ملکول‌های mRNA اوکاریوتی دارای خصوصیات ساختمانی متفاوتی هستند که در هسته توسط سیستم‌های آنزیمی غیر از RNA پلیمراز اضافه می‌شوند. اینها شامل دم پلی (A) انتهای ۳'، نوکلئوتیدهای داخلی متیله و کلاهک انتهای ۵' می‌باشند. ملکول‌های mRNA بالغ، کوتاه‌تر از رونوشت‌های اولیه خود هستند. توالی‌های غیرکدکننده، تحت عنوان توالی‌های مداخله‌گر یا اینترون‌ها، در داخل pre-mRNA وجود دارند، ولی در ملکول‌های mRNA بالغ دیده نمی‌شوند. توالی‌های حفظ‌شده را **اگزون** گویند. الگوی عمومی برای پردازش mRNA در شکل ۱۲-۵ نشان داده شده است. ملکول‌های mRNAای که به‌طور کامل پردازش نشده‌اند، قسمت بزرگی از RNA هسته‌ای ناهمگن[3] (hnRNAs) را شامل می‌شوند.

پردازش pre-mRNA اوکاریوتی مستلزم تعدادی واکنش ملکولی است که می‌بایست همگی آنها با صحت بالا انجام شوند. این موضوع در خصوص برداشت اینترون‌ها از یک رونوشت mRNA واضح‌تر می‌باشد. یک نوکلئوتید اضافی در توالی کدکننده mRNA بالغ منجر به تغییر قالب خواندن پیام شده و تقریباً با اطمینان می‌توان گفت که پروتئین حاصل فاقد عملکرد خواهد بود. در حقیقت، جهش‌هایی که با برداشت اینترون تداخل می‌کنند، علت مهمی برای بیماری‌های ژنتیکی انسان، برای مثال در برخی موارد β-تالاسمی‌ها (ارتباط بالینی ۴-۵)، هستند. با توجه به آنکه برخی ژن‌های انسانی مهم تا بیش از ۹۰٪ توالی



شکل ۱۲-۵ پردازش RNA طی طویل‌سازی رونویسی. فسفریلاسیون دومن انتهای کربوکسیل RNA پلیمراز II (RNPII) رونویسی را به فاز طویل‌سازی می‌کشاند و منجر به فراخوانی عوامل پردازشگر می‌شود. وقتی پیش‌ساز mRNAای که به‌طور نسبی تکمیل شده است (در حال سنتز است) از کمپلکس رونویسی خارج می‌گردد، اسپلایسئوزوم اینترون‌ها را برداشت می‌کند. وقتی پیام پلی‌آدنیلاسیون می‌رسد، کمپلکس پلی‌آدنیلاسیون mRNA در حال سنتز را می‌شکند و دم پلی(A)، n(A)، را اضافه می‌کند. RNA تازه‌ساز باقیمانده توسط ۵' اگزونوکلئازها تخریب می‌شود، در حالی‌که mRNA پردازش‌شده برای ترجمه به خارج هسته منتقل می‌گردد.

1. Small nucleolar ribonucleoprotein 2. Guide RNA 3. Heterogeneous nuclear RNA

ارتباط بالینی ۴-۵

تالاسمی به‌دلیل نقص در سنتز RNA پیک

تالاسمی‌ها نقص‌های ژنتیکی در سنتز زنجیرهای پپتیدی گلوبینی α و β هستند؛ کمبود زنجیرهای گلوبین β را β-تالاسمی گویند، در حالی که کمبود زنجیرهای α را α-تالاسمی می‌نامند. بیماران مبتلا به β-تالاسمی در حدود شش ماهگی که سنتز HbF متوقف شده و سنتز HbA غالب می‌گردد، دچار کم‌خونی می‌شوند. برحسب شدت علائم، بیماری به دو نوع تالاسمی ماژور، همراه با کمبود شدید سنتز گلوبین، و تالاسمی مینور، همراه با عدم تعادل خفیف‌تر، تقسیم می‌شوند. گاهی یک حالت حدواسط مشاهده می‌گردد. درمان تالاسمی ماژور مستلزم انتقال خون مکرر می‌باشد که خطر مشکلات مربوط به سرباری آهن را افزایش می‌دهد. رسوب آهن در بافت‌های محیطی که به آهن هموسیدروز گفته می‌شود، منجر به مرگ قبل از بزرگسالی می‌شود، مگر آن که درمان با شلاتور (برداشت‌کننده آهن) موفق باشد. حاملین بیماری معمولاً یا تقریباً بدون علامت هستند. از نظر نژادی، این بیماری در مردمان مدیترانه‌ای، عربی و آسیای شرقی شایع است. همانند کم‌خونی سلول-داسی (HbS) و کمبود گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز، ناهنجاری در گلبول‌های قرمز حاملین تا حدودی سبب حفاظت در برابر مالاریا می‌شود. نقشه‌ها و نواحی که یکی از این بیماری‌ها در جمعیت بومی فراوان است، با نواحی از جهان منطبق می‌باشد که مالاریا آندمیک است.

شایع‌ترین شکل α-تالاسمی ناشی از یک حذف ژنتیکی است که احتمالاً از کراسینگ اُور نابرابر بین آلل‌های گلوبین α دو برابرشده مجاور حاصل می‌شود. برعکس، β-تالاسمی می‌تواند نتیجه انواع مختلفی از جهش‌ها باشد. حوادث شناخته‌شده شامل جهش‌های منتهی به تغییر قالب در توالی کدکننده گلوبین β و همچنین جهش‌های منتهی به خاتمه نارس سنتز پپتید می‌باشند. بسیاری از β-تالاسمی‌ها از جهش‌هایی حاصل می‌شوند که بر روی بیوسنتز mRNA گلوبین β تأثیر می‌گذارند. نقص‌های ژنتیکی شناخته شده‌اند که بر روی پروموتر ژن تأثیر گذاشته و منجر به رونویسی غیرمؤثر می‌گردند. جهش‌های دیگر منجر به پردازش انحرافی رونوشت درحال سنتز، یا طی اسپلایسینگ دو اینترون آن از pre-mRNA یا طی پلی‌آدنیلاسیون پیش‌ساز mRNA می‌شوند. در داخل متن کتاب به مثال‌هایی پرداخته شده است که در خصوص آنها نقص ملکولی به تشریح اساس کلی سنتز mRNA کمک کرده است.

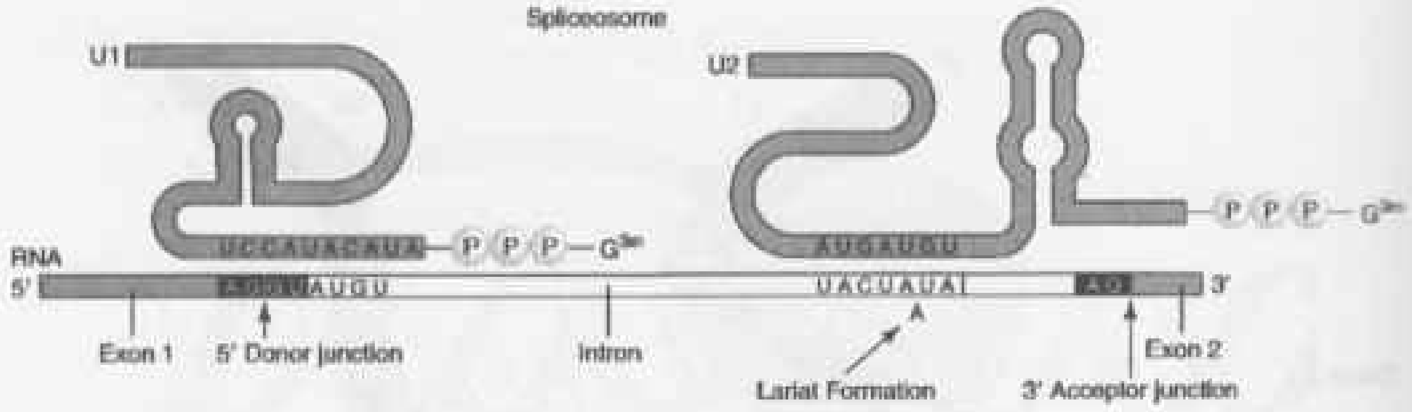
اینترونی دارند، این وظیفه سلول‌ها حتی وحشتناک‌تر نیز می‌شود. واکنش‌های پیچیده برداشت اینترون‌ها توسط سیستم‌های آنزیمی ریبونوکلئوپروتئینی چند جزئی در هسته انجام می‌شوند؛ بعد از تکمیل این واکنش‌ها، mRNA به داخل سیتوپلاسم انتقال داده شده و در این محل برای شروع ترجمه با ریبوزوم‌ها تعامل می‌کند. بیشتر پردازش همزمان با رونویسی می‌باشد.

طی رونویسی در اوکاریوت‌ها، RNA پلیمراز II آنزیم‌های پردازشی را فرا می‌خواند

در بزرگترین زیرواحد RNA پلیمراز II، یک دومن انتهای کربوکسیل (CTD) وجود دارد که در جفت‌شدن رونویسی و پردازش نقش دارد. وقتی RNA پلیمراز II در حالت شروع می‌باشد، CTD تغییرنیافته است. وقتی طول رونوشت به ۲۵ نوکلئوتید می‌رسد، CTD شدیداً فسفریله می‌باشد. CTD فسفریله به‌طور متوالی آنزیم کلاهک‌گذار، کمپلکس اسپلایسینگ و کمپلکس پلی‌آدنیلاسیون را فرا می‌خواند.

ایجاد کلاهک

وقتی کمپلکس رونویسی در طول DNA حرکت می‌کند، کمپلکس آنزیمی کلاهک‌گذار انتهای ′5 mRNA درحال سنتز را تغییر می‌دهد. ایجاد کلاهک مستلزم سنتز یک پیوند



شکل ۱۳-۵ مکانیسم شناسایی محل اسپلایس. شناسایی محل اسپلایس ۵′ مستلزم جفت‌شدن این محل اتصال اینترون- اگزون و U1 RNA snRNP می‌باشد. با ایجاد جفت بازها، اینترون برای برداشت هدفمند می‌شود.

۵′-۵′ تری‌فسفاتی با افزودن یک ریشه G می‌باشد. این ساختمان با متیلاسیون بیشتر تغییر داده می‌شود.

برداشت اینترون‌ها از پیش‌سازهای mRNA

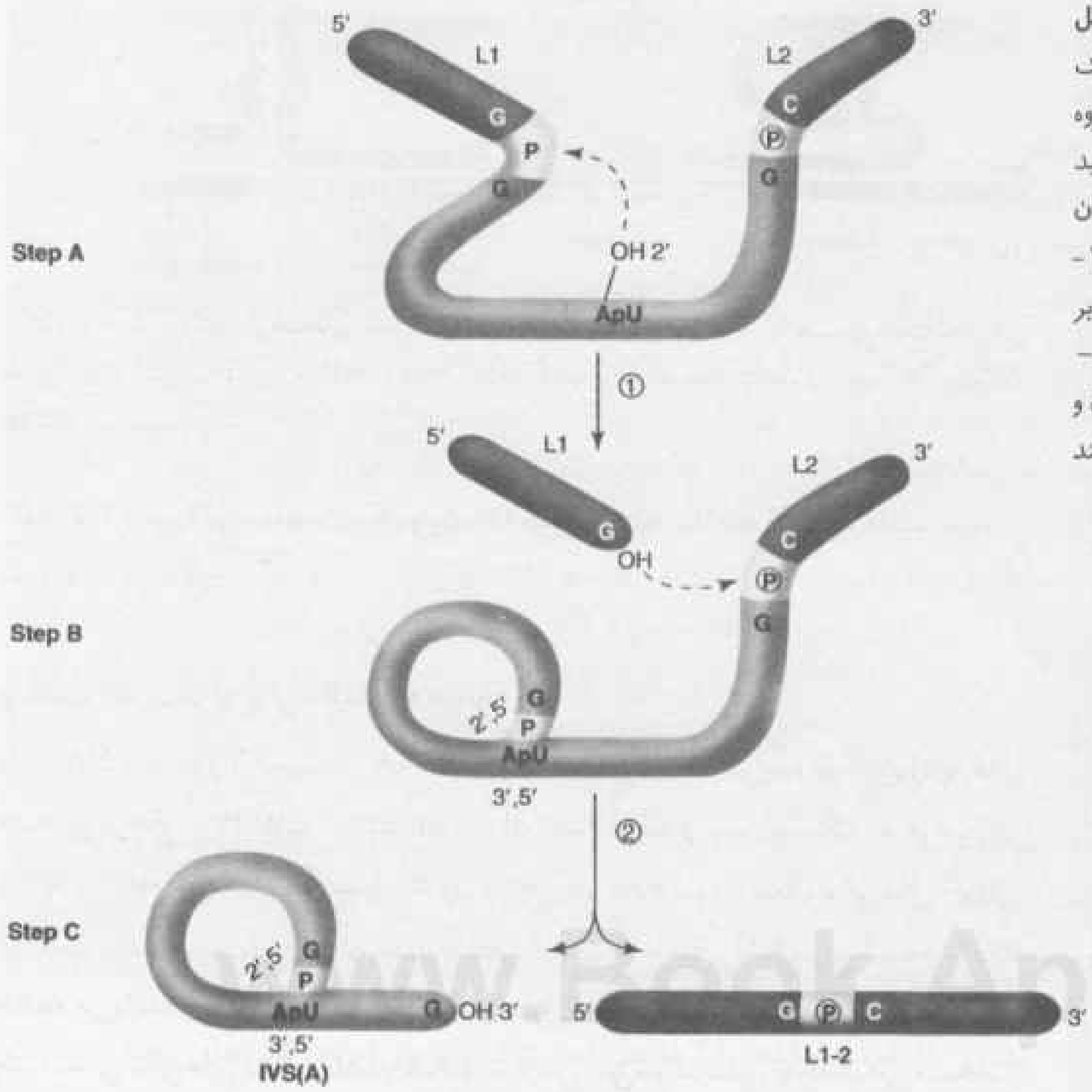
وقتی pre-mRNA از کمپلکس RNA پلیمراز خارج می‌شود، سریعاً **ریبونوکلئوپروتئین‌های هسته‌ای کوچک**[1]، **snRNPs** («snurps») به آن اتصال یافته و اسپلایسینگ دو مرحله‌ای RNA را انجام می‌دهند: شکستن اینترون در جایگاه ۵′دهنده و اتصال توالی‌های اگزونی فرادست و فرودست به یکدیگر. تقریباً تمامی اینترون‌ها با توالی GU شروع شده و با AG خاتمه می‌یابند؛ اینها را به ترتیب اتصالات اینترون-اگزون دهنده و گیرنده می‌نامند. هر چند، تمامی توالی‌های GU و AG در RNA اسپلایس نمی‌شوند. سلول به چه شکلی مشخص می‌کند که کدام توالی‌ها GU در اینترون‌ها قرار دارند (و بنابراین باید برداشت شوند) و کدام موارد می‌بایست در mRNA بالغ باقی بمانند؟ این تمایز با تشکیل جفت‌های بازی بین U1 RNA و توالی mRNA پیش‌ساز در اطراف توالی GU دهنده صورت می‌گیرد (شکل ۱۳-۵؛ ارتباط بالینی ۵-۵). snRNP دیگر که حاوی U2 RNA است، توالی‌های مهمی را در انتهای ۳′ گیرنده اینترون شناسایی می‌کند. سپس انواع دیگری از snRNP، شامل موارد حاوی U5 و U6، به پیش‌ساز RNA اتصال یافته و کمپلکس بزرگی به نام **اسپلایسئوزوم**[2] (مشابه همایش ریبونوکلئوپروتئینی بزرگ در سنتز پروتئین، یعنی ریبوزوم) را به‌وجود می‌آورند. اسپلایسئوزوم از ATP برای انجام برداشت صحیح اینترون استفاده می‌کند. اول، پیوند فسفودی‌استری بین اگزون و توالی GU دهنده شکسته شده و گروه ۳′-هیدروکسیل آزاد را در انتهای اولین اگزون و یک ۵′-فسفات را بر روی G دهنده اینترون باقی می‌گذارد. سپس از این pG برای ایجاد یک اتصال غیرمعمول با گروه ۲′-هیدروکسیل یک آدنوزین موجود در اینترون و تولید یک ساختمان RNA منشعب یا **کمندی**[3] استفاده می‌کند که در شکل ۱۴-۵ نشان داده شده است. بعد از تشکیل کمند، مرحله دوم اسپلایسینگ رخ می‌دهد.

ارتباط بالینی ۵-۵

خودایمنی در بیماری بافت همبند

آنتی‌بادی‌های موجود در سرم مبتلایان به بیماری‌های مختلف بافت همبند، کمپلکس‌های ریبونوکلئو-پروتئینی متفاوتی را شناسایی می‌کنند. مبتلایان به لوپوس اریتروماتوس سیستمیک یک نوع آنتی‌بادی سرمی دارند که با Sm نشان داده می‌شود و آنتی-بادی‌های موجود در بیماری بافت همبند مخلوط با RNP نشان داده می‌شوند. هر کدام از این آنتی-بادی‌ها یک جایگاه متفاوت را بر روی کمپلکس RNA-پروتئین (U1-RNP) شناسایی می‌کنند که در پردازش mRNA در سلول‌های پستانداران نقش دارد. کمپلکس U1-RNP حاوی U1 RNA، یک توالی ۱۶۵ نوکلئوتیدی شدیداً حفظ‌شده در میان پستانداران، است که در انتهای ۵′ آن توالی مکمل با محل‌های اسپلایس اینترون-اگزون وجود دارد. افزودن این آنتی‌بادی به آزمون‌های اسپلایسینگ داخل آزمایشگاه، احتمالاً از طریق برداشت U1 RNA از این واکنش، مانع اسپلایسینگ می‌شود. سرم مربوط به بیماران مبتلا به سایر بیماری‌های بافت همبند، آنتی‌ژن‌های هسته‌ای، پروتئین‌های هستکی و یا سانترومر کروموزومی مختلفی را شناسایی می‌کنند. نشان داده شده است که سرم بیماران مبتلا به میوزیت، آنتی‌ژن‌های سیتوپلاسمی نظیر آمینوآسیل-tRNA سنتتازها را شناسایی می‌کنند. با وجود این که آنتی‌بادی‌هایی گزارش شده‌اند که وارد سلول‌های حاوی گیرنده Fc می‌شوند، ولی شواهدی برای نقش آن در مکانیسم بیماری خودایمنی وجود ندارد.

1. Small nuclear rinonuleoproteins   2. Spliceosome   3. Lariat

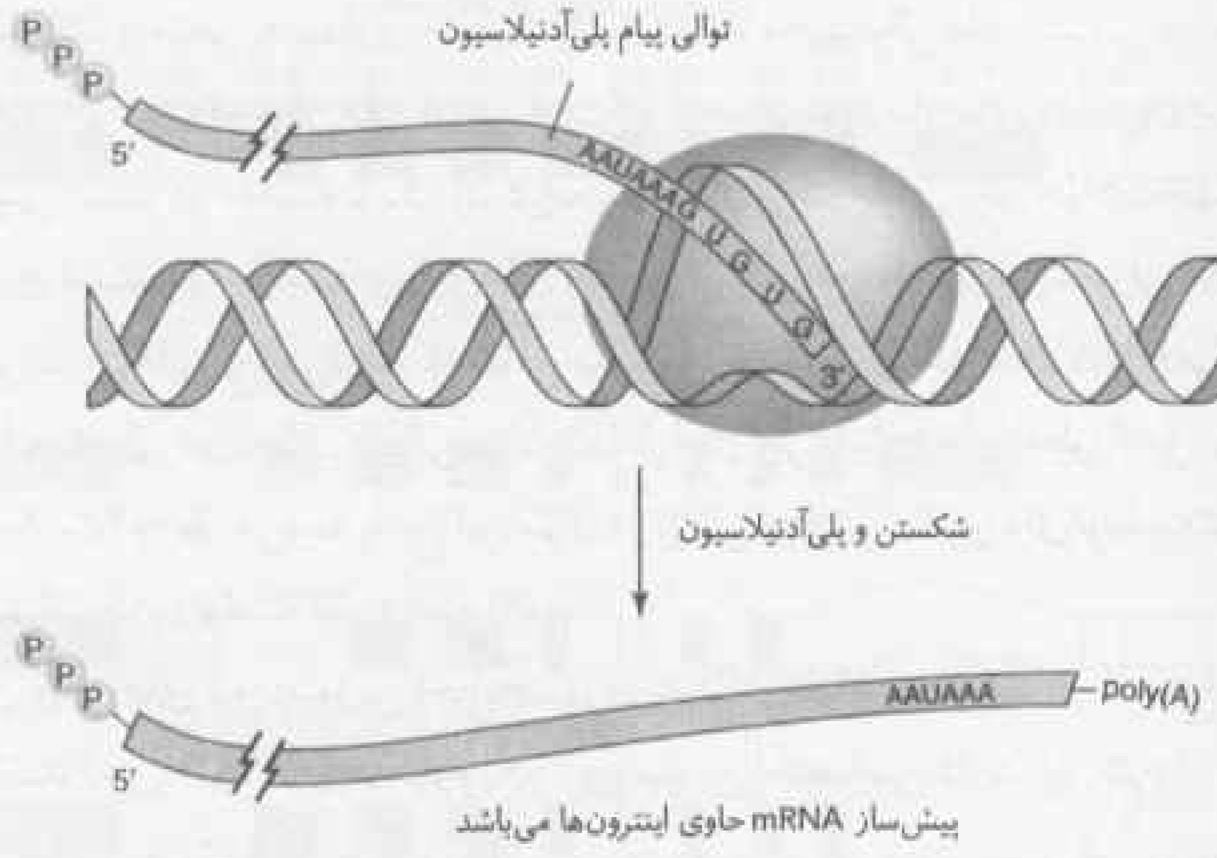


شکل ۱۴-۵ طرح فرض‌شده برای اسپلایسینگ شامل ایجاد ساختمان کمند. RNA پیک با دو اگزون (تیره) و یک اینترون مداخله‌گر (روشن) شرح داده شده است. یک گروه ۳' – هیدروکسیل از توالی اینترون با ۵' – فسفات نوکلئوتید انتهای ۵' واکنش نموده و تولید یک اتصال ۵' - ۲' و ساختمان کمند می‌کند. به‌طور همزمان، پیوند فسفودی‌استر اگزون ۱ - اینترون شکسته‌شده و یک انتهای ۳' – هیدروکسیل بر روی این اگزون به‌وجود می‌آورد که برای واکنش با ۵' – فسفات اگزون ۲ آزاد می‌باشد؛ نتیجه جایگزینی اینترون و تولید mRNA اسپلایس‌شده می‌باشد. در ادامه این کمند اینترونی توسط نوکلئازهای سلولی هضم می‌شود.

پیوند فسفودی‌استری که بلافاصله بعد از AG قرار دارد، شکسته شده و دو اگزون به یکدیگر دوخته می‌شوند.

پلی‌آدنیلاسیون

RNA پلیمراز رونویسی ژن را ادامه می‌دهد تا به یک توالی پیام پلی‌آدنیلاسیون برسد (شکل ۱۵-۵). این توالی، که اشتراک AAUAAA را دارد، در mRNA بالغ ظاهر می‌شود، ولی قسمتی از ناحیه کدکننده آن نیست. بلکه حاوی پیام شکستن mRNA درحال سنتز در فاصله حدود ۲۰ نوکلئوتید در فرودست آن می‌باشد. سپس توالی پلی (A) توسط یک پلیمراز تخصص‌یافته به انتهای ۳' آزاد حاصل از این شکست اضافه می‌گردد. دومن انتهای کربوکسیل RNA پلیمراز II یک کمپلکس شکست و پلی‌آدنیلاسیون را به رونوشت فرا می‌خواند. خاتمه رونویسی توسط RNA پلیمراز در حال طویل‌سازی در فرودست رخ داده و با واکنش شکست و پلی‌آدنیلاسیون جفت می‌شود، هر چند جزئیات مکانیسم واضح نمی‌باشد. نتیجه نهایی پردازش یک mRNA کدکننده کاملاً وظیفه‌دار است که تمامی اینترون‌های آن برداشت شده و آماده هدایت سنتز پروتئین می‌باشد.



شکل ۱۵-۵ **شکست و پلی‌آدنیلاسیون پیش‌سازهای اوکاریوتی mRNA.** انتهای ′۳ ملکول‌های mRNA اوکاریوتی با پردازش حاصل می‌شود. توالی AAUAAA موجود در mRNA محل شکستن پیش‌ساز mRNA را مشخص می‌کند. ′۳- هیدروکسیل آزاد mRNA پرایمری برای سنتز پلی(A) می‌باشد.

جهش در پیام‌های اسپلایسینگ در انسان ایجاد بیماری می‌کند

اسپلایسینگ RNA بالغ یک فرایند پیچیده وابسته به حوادث ملکولی متعددی است. در صورتی‌که این حوادث با دقت انجام نشوند، mRNA وظیفه‌دار تولید نمی‌گردد. این موضوع در تالاسمی انسانی مشاهده می‌شود که بر روی سنتز متعادل زنجیرهای گلوبینی α و β تأثیر می‌گذارد (ارتباط بالینی ۴-۵ را ببینید). برخی جهش‌هایی که منجر به α-تالاسمی می‌شوند با اسپلایسینگ پیش‌سازهای mRNA گلوبین β تداخل می‌کنند. برای مثال، می‌دانیم که تمامی توالی‌های اینترونی با دی‌نوکلئوتید GU شروع می‌شوند. جهش در G به A در این توالی به معنی آن است که ماشین اسپلایسینگ دیگر این دی‌نوکلئوتید را به عنوان جایگاه دهنده شناسایی نمی‌کند. لذا اسپلایسینگ این اتصال اگزون- اینترون صحیح را رد خواهد کرد. نتیجه ظهور توالی‌های اضافی در mRNA گلوبین β می‌باشد که به‌طورطبیعی می‌بایست خارج می‌شدند، یا برعکس ممکن است توالی‌هایی از محصول mRNA حذف شوند (شکل ۱۶-۵). در هر صورت، گلوبین β وظیفه‌دار به‌میزان کمتر سنتز خواهد شد و کم‌خونی مشخص این بیماری به وجود خواهد آمد.



شکل ۱۶-۵ **تغییر نوکلئوتیدی در یکی از محل‌های اتصال اینترون- اگزون یک ژن β-گلوبینی انسان که منجر به اسپلایسینگ اشتباه و β-تالاسمی می‌شود.** این شکل الگوی اسپلایسینگ رونوشتی را نشان می‌دهد که تغییری از G-U به A-U را در دو نوکلئوتید ابتدایی اولین اینترون دارد. ازدست‌رفتن این توالی ثابت به معنی آن است که محل اسپلایس صحیح قابل استفاده نیست؛ لذا توالی‌های رونوشتی که با U1 snRNA ایجاد جفت باز می‌کنند، کمتر از محل اتصال توالی صحیح به عنوان دهنده اسپلایس مورد استفاده قرار می‌گیرد. خطوط زاویه‌دار، بخش‌هایی را نشان می‌دهد که در رونوشت‌های جهش‌یافته به یکدیگر اسپلایس شده‌اند. توجه داشته باشید که برخی از ملکول‌های پیش‌ساز mRNA جهش‌یافته طوری اسپلایس می‌شوند که قسمت‌هایی از دو اینترون ابتدایی (به‌صورت کادرهای سفید نشان داده شده‌اند) در محصول پردازش‌شده باقی می‌مانند. در موارد دیگر، محل اتصال دهنده در داخل اولین اگزون قرار گرفته و اولین اگزون و قسمت‌هایی از اولین اگزون حذف می‌شوند. در هیچ حالتی گلوبین نوع وحشی mRNA تولید نمی‌شود.

اسپلایسینگ متفاوت Pre-mRNA می‌تواند منجر به سنتز چندین ایزوفرم پروتئینی از یک توالی کدکننده DNA شود

وجود توالی‌های اینترونی نوعی تناقض است. اینترون‌ها می‌بایست طوری با دقت برداشت شوند که mRNA بتواند به شکل صحیحی پروتئین را کد کند. همان‌طورکه در ارتباط بالینی ۴-۴ شرح داده شده است، یک جهش تک بازی می‌تواند به شکل مؤثری با اسپلایسینگ

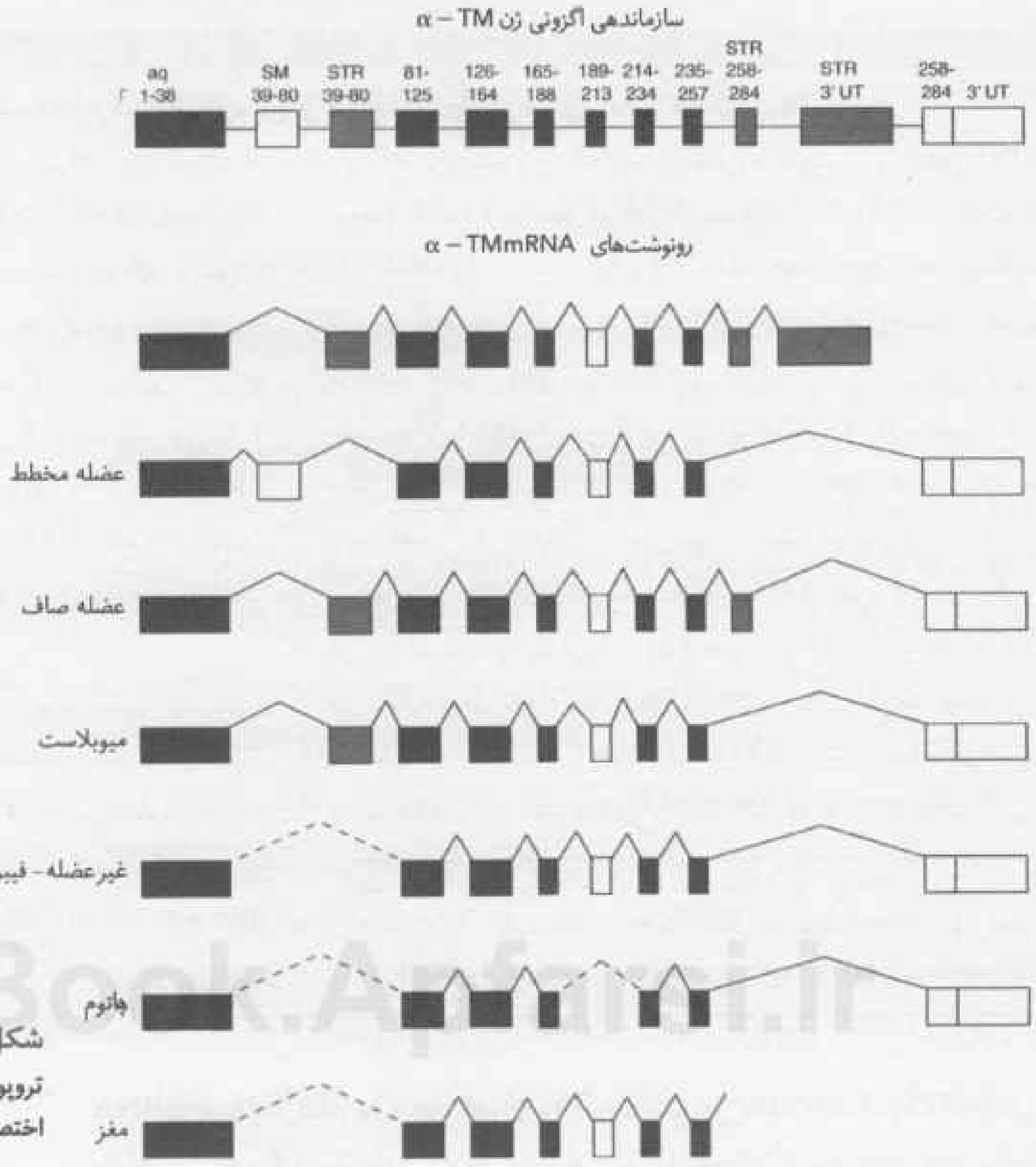
تداخل کند و منجر به بیماری جدی شود. به علاوه، وجود توالی‌های اینترونی در یک ژن به معنی آن است که توالی کلی آن بسیار بزرگتر از میزان مورد نیاز برای کدنمودن محصول پروتئینی است. در مقایسه با یک ژن کوچک، یک ژن بزرگ هدفی برای حوادث جهش‌زای بیشتری است. در حقیقت، بیماری‌های ژنتیکی انسانی معمول نظیر دیستروفی عضلانی دوشن در ژن‌هایی رخ می‌دهند که شامل میلیون‌ها جفت باز از اطلاعات DNA می‌باشند. چرا طبیعت طی دوره زمانی طولانی مدت تکامل اوکاریوتی، اینترون‌ها را به‌طور کامل برداشت نکرده است؟ به نظر می‌رسد پاسخ این سؤال در توانایی پردازش تمایزی برای تولید پروتئین‌های متعدد از یک رونوشت قرار داشته باشد.

پروتئین‌های تروپومیوزین اجزاء ضروری دستگاه انقباضی موجود در سه نوع عضله می‌باشند (ص ۱۲۹۳) و هر کدام یک تروپومیوزین اختصاصی دارند. این تنوع از یک ژن واحد حاصل می‌شود که به یک رونوشت اولیه رونویسی می‌شود. سپس این رونوشت به صورت نشان داده‌شده در شکل ۱۷-۵ پردازش می‌گردد. هر نوع سلول، رونوشت اولیه تروپومیوزین را به‌طریق مشخصی پردازش می‌کند. انواع mRNA حاصل ترجمه شده تا تروپومیوزین‌های مشخص هر نوع سلول را تولید کنند. این موضوع عمومی در بیان ژن اوکاریوتی است. تنها ۲۵,۰۰۰۰-۲۰,۰۰۰ ژن کدکننده پروتئین در ژنوم انسانی وجود دارد؛ هرچند، تقریباً دو سوم اینها منجر به تولید رونوشت‌هایی می‌شوند که به شکل متفاوتی اسپلایس می‌گردند. رونوشت‌هایی که به‌طورمتفاوت اسپلایس شده‌اند به محصولات پروتئینی ترجمه می‌شوند که موقعیت‌ها، تعاملات ملکولی، یا خصوصیات آنزیمی متفاوتی دارند. لذا وجود اینترون‌ها به موجود زنده این امکان قوی را می‌دهد تا بتواند تنوع پروتئینی را بوجود آورند. اغلب انتخاب یک الگوی اسپلایسینگ اختصاصی توسط فاکتورهای پروتئینی تنظیم می‌شود که به توالی‌هایی در داخل یک اگزون متصل می‌شوند. این پروتئین‌ها می‌توانند سبب افزایش یا سرکوب اسپلایسینگ در اتصالات اینترون - اگزونی مجاور گردند.

۵-۵ • انتقال به خارج RNA و کنترل کیفی

ملکول‌های RNA پیک، انتقالی و ریبوزومی در سیتوپلاسم فعالیت می‌کنند. انتقال به‌خارج هسته از طریق منافذ هسته انجام می‌شود. همایش منفذ هسته به صورت استوانه‌ای است که بر روی غشاء پل می‌زند. در داخل این استوانه دو حلقه متراکم و یک «توپی[1]» مرکزی وجود دارد. یون‌های کوچک قادرند از میان منفذ موجود در بین توپی و حلقه‌ها عبور کنند، ولی ملکول‌های RNA برای عبور از میان این فضا بسیار بزرگ هستند. انتقال RNA به‌خارج هسته از میان یک کانال موجود در این توپی انجام می‌شود؛ برای این فرایند لازم است ملکول‌های RNA به پروتئین‌ها اتصال یافته و تولید ذرات ریبونوکلئوپروتئینی کنند. حرکت ملکول‌های RNA ریبوزومی بعد از همایش آنها به شکل ریبوزوم در هستک رخ می‌دهد. ملکول‌های

1. Plug



شکل ۱۷-۵ اسپلایسینگ متفاوت رونوشت‌های ژن تروپومیوزین در خانواده‌ای از پروتئین‌های تروپومیوزین اختصاصی - بافت.

RNA انتقالی ممکن است به آمینوآسیل -tRNA سنتتازها اتصال داشته باشند، لذا می‌توانند قبل از انتقال به خارج، در داخل هسته آمینوآسیله شوند. ملکول‌های mRNA پیک در داخل کمپلکس‌هایی به خارج انتقال داده می‌شوند که یک پروتئین اتصال به کلاهک در انتهای ′5 و پروتئین‌های اتصالی RNA همراه با بقیه توالی دارند. این فرایند نیاز به انرژی متابولیکی به شکل GTP، توالی‌های پیام اختصاصی در پروتئین و یک GTPase پروتئین G دارد.

اسپلایسینگ RNA و انتقال به خارج سبب تضمین کنترل کیفیت سلامت mRNA می‌شود. کدون خاتمه زنجیر (یکی از سه کدون بی‌معنی UAA، UAG و UGA) یک mRNA معمولاً در آخرین اگزون قرار دارد. در صورتی‌که mRNA یک کدون بی‌معنی فرادست می‌داشت، پروتئین کدشده کوتاهتر از پروتئین طبیعی می‌شد (ارتباط بالینی ۶-۵). این پروتئین کوتاهتر احتمالاً فاقد عملکرد بوده و ممکن است با عملکرد سلولی تداخل کند. مسیر زوال به‌واسطه کدون بی‌معنی[1] مانع انتقال و ترجمه ملکول‌های mRNAای می‌شود که **کدون خاتمه زنجیر** آنها در فرادست آخرین اگزون قرار دارد. چند پروتئین اسپلایسوزومی بر روی

1. Nonsense-mediated decay pathway

ارتباط بالینی ۶-۵

آنزیم‌های ویرایش اسید نوکلئیک: یک دفاع ضدویروسی و همچنین راهی برای تغییر بیان ژن‌ها

آپولیپوپروتئین B، که یک بازیگر کلیدی در متابولیسم کلسترول است، به دو شکل وجود دارد: یکی با وزن ملکولی ۴۸,۰۰۰ که در روده تولید می‌شود، و دیگری با وزن ملکولی ۱۰۰,۰۰۰ که در کبد ساخته می‌شود[1]. هر دو ملکول RNA از یک ژن رونویسی می‌شوند، ولی ایزوفرم اختصاصی-روده متحمل یک واکنش ویرایشی می‌گردد. یک آنزیم سیتیدین دآمیناز، تحت عنوان آنزیم ویرایشگر mRNA آپولیپوپروتئین B، کاتالیتیک پلی‌پپتید ۱ (APOBEC1)[2] یک C اختصاصی در mRNA آپو B را به U تغییر می‌دهد که نتیجه آن تبدیل کدون CAA (گلوتامین) به کدون UAA (خاتمه) می‌باشد. آنزیم‌های APOBEC خانواده‌ای را تشکیل می‌دهند و ایزوفرم‌های مختلف در انواع متفاوت سلول‌ها بیان می‌شوند.

وقتی با اسپلایسینگ تمایزی یک رونوشت یا یک ژن دو برابر شده می‌توان به چنین نتیجه‌ای (تولید پروتئین‌های مختلف) رسید، چرا از این مکانیسم غیرمعمول استفاده می‌شود؟ پاسخ در خصوصیات خانواده APOBEC آنزیم‌ها قرار دارد. سلول‌های T اولیه و ماکروفاژها نسبت به عفونت HIV نسبتاً مقاوم می‌باشند. بیاد دارید که HIV یک ژنوم RNA دارد که می‌بایست به cDNA رونویسی معکوس شود (ص.۳۴۹). یک ایزوفرم کدشده توسط میزبان از خانواده APOBEC، تحت عنوان APOBEC3G، همراه با ذره ویروسی، در هنگام جوانه‌زدن از یک سلول عفونت‌یافته، حمل می‌شود. APOBEC3G ریشه‌های متعدد C موجود در محصول ابتدایی cDNA را به داکسی-U تبدیل می‌کند. سپس این Uها سبب قرارگیری dAها در هنگام سنتز رشته دوم cDNA می‌شوند که همان معنی RNA ویروسی را دارد. ویروس‌هایی که جهش‌های زیادی دارند، دچار نقص در فازهای دیررس چرخه زندگی می‌باشند.

هرچند، APOEC3G سبب مقاومت کامل نمی‌شود. در روش دیگر فرار ارگانیسم‌های بیماریزا از دفاع میزبان، HIV پروتئینی به‌نام Vif را کد می‌کند که به‌طور اختصاصی APOEC3G را برای تخریب توسط پروتئازوم هدفمند می‌سازد. Vif مرتبط با آنزیم‌های اوبی‌کوئیتین-E3 لیگاز است، ولی مکانیسم دقیق هدفمندسازی APOEC3G توسط آن نامشخص می‌باشد.

۱. همان‌طور که در جدول ۱-۱۸ است. وزن ملکولی این دو به‌ترتیب برابر ۲۶۴,۰۰۰ و ۵۱۲,۰۰۰ می‌باشد. ۴۸ و ۱۰۰ اشاره به درصد ترجمه mRNA مربوط دارد. مترجم

2. Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1

mRNA اسپلایس‌شده در محل اتصال دو اگزون باقی می‌ماند. به‌دنبال یک کدون بی‌معنی موجود در یک اگزون فرادست، این پروتئین‌های محل اتصال[1] وجود دارند؛ این ملکول‌های mRNA برای زوال به‌واسطه کدون بی‌معنی هدفدار می‌شوند. شناسایی کدون بی‌معنی فرادست می‌بایست نیازمند ترجمه باشد. به شکل آشکار، اولین ریبوزوم ترجمه‌کننده، پروتئین‌های محل اتصال اگزون را برداشت می‌کند. در صورتی‌که این ریبوزوم قبل از برداشت تمامی پروتئین‌های محل اتصال، در محل یک کدون خاتمه زنجیر متوقف شود، یک مجموعه اختصاصی نوکلئازها mRNA را تخریب و مانع ترجمه آن می‌گردد. به‌طورمشابه، mRNAای که فاقد کدون بی‌معنی خاتمه-زنجیر طبیعی است، برای تخریب هدفدار می‌شود، زیرا به احتمال زیاد این mRNA به غلط سنتز و یا به اشتباه شکسته شده است. همچنین ترجمه این mRNA منجر به سنتز یک پروتئین کوتاه خواهد شد.

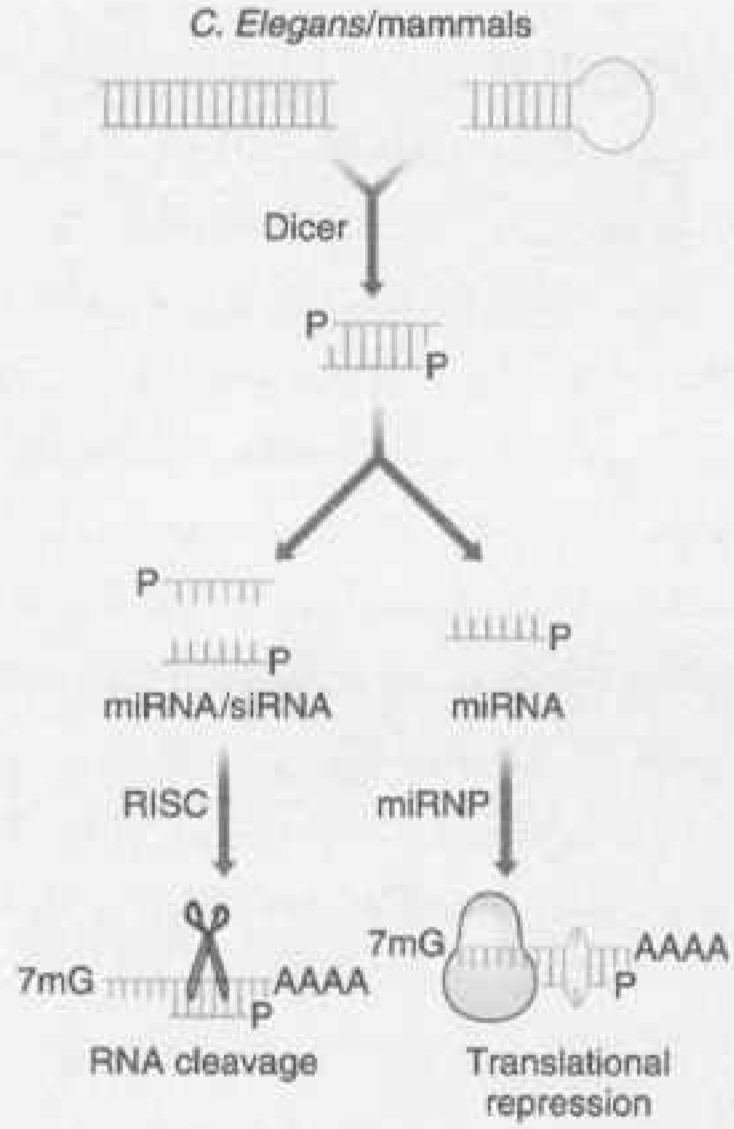
۶-۵ . تداخل RNA

به‌طور معمول نواحی دو-رشته موجود در mRNA سلولی تقریباً کوتاه و به طول کمتر از ۱۰ باز هستند. توالی‌های دو-رشته بلندتر می‌توانند از همانندسازی RNA ویروس‌ها، رونویسی

1. Junction proteins

توالی‌های تکراری یا نواحی بلندتر برخی ملکول‌های mRNA طبیعی حاصل شوند. این ملکول‌های RNA دو-رشته به ملکول‌های **RNA مهاری**[1] **(RNAi)** تک-رشته پردازش می‌شوند که بعداً در جهت خاموش‌سازی بیان ملکول‌های mRNA هدف خود عمل می‌کنند.

مسیر پردازش این ملکول‌های RNA در شکل ۱۸-۵ نشان داده شده است. یک RNase اختصاصی RNA دو-رشته (عضوی از خانواده RNase III) ابتدا RNA دو-رشته را به یک نوع دو-رشته کوتاه‌تر پردازش می‌کند که به خارج هسته انتقال داده می‌شود. در داخل سیتوپلاسم، این RNA دو-رشته توسط RNase III دیگری به‌نام دایسر[2] بیشتر پردازش شده تا تولید یک RNA دو-رشته کوچک به طول حدود ۲۱ جفت باز گردد. سپس این RNA دو-رشته توسط کمپلکس پروتئینی به‌نام کمپلکس خاموش‌سازی RNA-القاء شده[3] (RISC) یا پروتئین micro-RNA-[4] (miRNP) باز می‌شود. در هر صورت، یک رشته از دورشته RNA انتخاب می‌شود که تقریباً همیشه رشته مکمل mRNA هدف می‌باشد. سپس این RNA کوچک متصل به پروتئین با ایجاد جفت باز به mRNA اتصال یافته و سبب دو رخداد می‌شود. در صورتی‌که حالت مکمل کامل وجود داشته باشد (این RNA را RNA کوچک مهاری[5] [siRNA] گویند)، آنزیم‌های کمپلکس RISC رشته mRNA را می‌شکنند. در صورتی که حالت مکمل ناقص وجود داشته باشد (این RNA را **RNA ریز**[6] **[miRNA]** گویند)، mi-RNP ترجمه mRNA را با ایجاد جفت باز miRNA و mRNA مهار می‌کند. تداخل RNA[7] کارامد است، زیرا یک کمپلکس RISC-siRNA می‌تواند ملکول‌های متعدد mRNA را تجزیه کند و سرکوب ترجمه ممکن است منجر به تخریب mRNA گردد. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که ملکول‌های miRNA ممکن است بیان تا یک سوم تمامی ژن‌های پستانداران را تنظیم کنند و درگیری ملکول‌های RNA غیرکدکننده در تولید هتروکروماتین به معنی آن است که ممکن است رونویسی و همچنین ترجمه را تنظیم کنند. ارتباط بالینی ۷-۵ نقش ملکول‌های micro-RNA در سرطان‌زایی را مورد بحث قرار داده است.



شکل ۱۸-۵ اثرات ملکول‌های RNA مهاری کوچک بر روی متابولیسم mRNA اوکاریوتی. برای مثال، RNA دو-رشته حاصل از همانندسازی RNA ویروس‌ها (بالا چپ)، یا از سنجاق‌های موجود در رونوشت‌های بلند RNA (بالا راست)، توسط آنزیم دایسر به ملکول‌های RNA دو-رشته کوتاه پردازش می‌شود. یک رشته مکمل mRNA است و به کمک RISC (مسیر چپ) یا کمپلکس miRNP (مسیر راست) با آن جفت باز می‌شود. RISC ملکول mRNA را در ناحیه دو-رشته می‌شکند، در حالی‌که ایجاد جفت باز با miRNP سبب توقف ترجمه mRNA می‌گردد.

۷-۵ • جفت‌شدن ترمیم DNA با رونویسی

یک ضایعه شیمیایی در DNA تنها زمانی بر روی بیان ژن تأثیر می‌گذارد که توالی تغییریافته رونویسی شود. توالی‌هایی که بیان نمی‌شوند، سبب مشاهده جهش نمی‌گردند. لذا احتمال دارد که ترمیم DNA معطوف به توالی‌هایی باشد که به‌طور فعال رونویسی می‌شوند. این جفت‌شدن رونویسی و ترمیم به این دلیل رخ می‌دهد که ضایعات DNA (نظیر دیمرهای سیکلوبوتان؛ ص ۲۲۸) بر روی رشته الگو سبب می‌شوند تا RNA پلیمراز II متوقف گردد. RNA پلیمراز متوقف‌شده پیامی را برای سیستم‌های برداشت-ترمیم جهت برداشت

1. Inhibitory RNA
2. Dicer
3. RNA-induced silencing complex
4. Micro-RNA-protein
5. Small inhibitory RNA
6. Micro-RNA
7. RNA interference

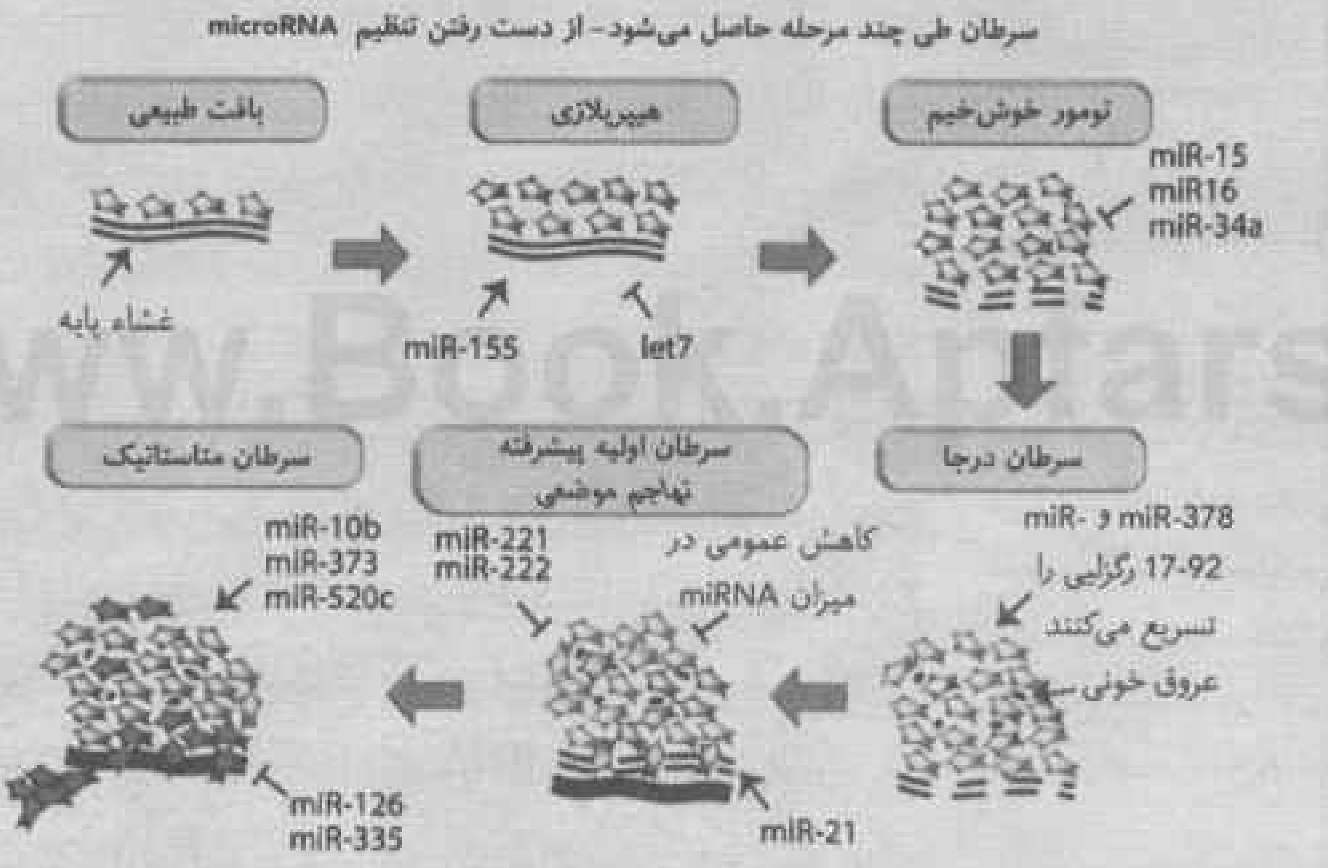
ارتباط بالینی ۷-۵

درگیری MicroRNAها در سرطانزایی

MicroRNAها (miRNAs) بیان ژن‌های هدف خود را با اتصال به ملکول‌های mRNA و جلوگیری از ترجمه آنها یا تحریک تخریب آنها، کاهش می‌دهند (شکل ۱۸-۵). حدود ۳۰٪ تمامی ملکول‌های mRNA انسانی پتانسیل تنظیم توسط miRNAها را دارند. از آنجایی که سرطان به‌واسطه اختلال در بیان ژن ایجاد می‌شود، منطقی به‌نظر می‌رسد که مسیر miRNA در سرطانزایی نقش داشته باشد. این فرضیه توسط چندین مشاهده مورد حمایت قرار گرفته است. (۱) ژن‌های مربوط به خانواده‌های miRNA اغلب در رده‌های سلولی سرطان انسانی حذف می‌شوند. (۲) برعکس، برخی لنفوم‌های سلول B با ازدیاد توالی‌های DNAای مشخص می‌گردند که مربوط به miRNAها هستند. (۳) let-7 miRNA با چندین اونکوژن تعامل دارد. کاهش miRNA let-7 با پیش‌آگهی ضعیف سرطان ریه سلول غیرکوچک[1] (NSCLC) ارتباط دارد. برعکس در یک مدل موشی NSCLC، ترانس‌ژن‌های let-7 وظیفه‌دار سبب کاهش فنوتیپ اونکوژنیک می‌شود. (۴) ملکول‌های miRNA متعددی مسیر p53 را غیرفعال می‌کنند که خود آغازگر آپوپتوز در پاسخ به آسیب ژنتیکی است.

این شواهد و داده‌های مشابه منجر به یک مدل کاری برای نقش ملکول‌های miRNA در نمو سرطان‌ها شده است (شکل را ببینید). هر چند این مدل کامل نیست، به درمان‌های احتمالی اشاره دارد که ممکن است هدف آنها این مکانیسم تنظیمی جدید باشد.

1. Nonsmall cell lung cancer



پیشرفت یک سلول طبیعی به یک فنوتیپ سرطان متاستاتیک تا حدودی توسط گونه‌های microRNA تنظیم می‌شود. پیکان به معنی تنظیم مثبت انتقال به یک مرحله متفاوت توسط micoRNA می‌باشد، در حالی که خط منتهی به خط (⊥) به‌معنی تنظیم منفی توسط microRNA می‌باشد.

توالی‌های تغییریافته و سنتز مجدد توالی صحیح ارسال می‌کند. به‌طور آشکار، این فرایند نمی‌تواند با RNA پلیمراز بزرگ متصل به DNA انجام شود، لذا رونوشت متوقف‌شده قربانی می‌شود. نقص در جفت‌شدن ترمیم با رونویسی، مشخصه سندروم کوکین[1] می‌باشد (ارتباط بالینی ۸-۵).

1. Cockayne syndrome

ارتباط بالینی ۸-۵

سندروم کوکین

سندروم کوکین (CS) (OMIM ۲۱۶۴۰۰) یک ناهنجاری اتوزومال مغلوب پیچیده است که در بیشتر موارد به دلیل جهش در یک یا دو ژن رخ می‌دهد. مبتلایان به CS دچار ناهنجاری‌های نموی و عصبی، اختلالات اسکلتی و شبکیه‌ای و همچنین تغییرشکل پرنده-مانند صورت[1] می‌شوند. بیماران معمولاً تا ۲۰ سالگی به دلیل دژنراسیون عصبی فوت می‌کنند. همچنین اکثر مبتلایان به سندروم کوکین حساسیت به نور دارند و در معرض سرطان پوست می‌باشند. این حساسیت نوری اشاره به نقص در ترمیم DNA دارد. برای مثال، گزرودرما پیگمنتوزوم (XP) نتیجه جهش‌هایی در تعدادی از اجزاء مسیر ترمیم DNA هستند. CS نیز یک نقص ترمیم DNA است. اکثر موارد سندروم کوکین حاصل جهش در دو ژن هستند؛ می‌دانیم که هر دوی این ژن‌ها در ترمیم آسیب DNA نقش دارند. CSB یک DNA هلیکاز وابسته به ATP را کد می‌کند که با پروتئین‌های درگیر در بازسازی کروماتینی مرتبط است. CSA یک اوبی‌کوئیتین E3 لیگاز است که به‌طور آشکار در نوسازی پروتئینی نقش دارد. پروتئین‌های CSA و CSB همراه با سایر پروتئین‌های ترمیم DNA در پاکسازی RNA پلیمراز متوقف‌شده و رونوشت‌ها و ترمیم الگوی آسیب‌دیده نقش دارند. بعد از ترمیم، امکان شروع تازه رونویسی از پروموتر وجود دارد و یا RNA پلیمراز II دیگری که در پشت سر ضایعه متوقف شده است، می‌تواند با رونویسی صحیح به راه خود ادامه دهد.

ترمیم جفت‌شده با رونویسی زمانی رخ می‌دهد که RNA پلیمراز در هنگام مواجه با یک باز تغییریافته (برای مثال، یک فتودیمر تیمینی) متوقف شود. رونویسی متوقف شده، رونوشت‌های نسبی تجزیه می‌شوند و رشته DNA الگو ترمیم می‌گردد. به‌طور آشکار، تسریع رونویسی توسط پروتئین CSB، ترمیم جفت‌شده با رونویسی را نیز تحریک می‌کند.

در صورتی که این تمام داستان باشد، آنگاه سندروم کوکین می‌بایست واریانتی از گزرودرما پیگمنتوزوم باشد؛ هر چند، مبتلایان به XP از نظر نمو و عصبی طبیعی هستند ولی حساسیت به نور را دارند. علل ایجاد خصوصیات دیگر CS چه هستند؟ احتمال دارد که این علائم دیگر ناشی از یک کمبود اولیه در طویل‌سازی رونویسی باشد که در نتیجه تغییر جهشی فاکتور طویل‌سازی CSB به وجود آمده است. این تفکر شناخت ما از ارتباط بین جهش و بیماری را افزایش می‌دهد. معمولاً بیماری‌های ژنتیکی توسط جهشی در فرایندهای بیوشیمیایی ایجاد می‌شوند که خارج از مسیرهای مرکزی اطلاعات سلول‌ها قرار دارند. این موضوع می‌تواند درست باشد چراکه مهار کلی سنتز DNA، RNA یا پروتئین می‌تواند در همان مراحل ابتدایی نموکشنده باشد. نقص‌های گسترده CSB می‌بایست ناشی از جهشی باشد که رونویسی برخی ژن‌ها را بیش از بقیه تحت تأثیر قرار می‌دهد.

1. Birdlike facial dysmorphia

۸-۵ • نوکلئازها و نوسازی RNA

نقش‌های مختلف RNA و DNA در بیان ژنتیکی در سرنوشت‌های متابولیکی آنها منعکس می‌باشد. لازم است ذخایر اطلاعات سلولی (DNA) حفظ شوند، لذا سیستم‌های ترمیمی و ویرایشی متعددی برای DNA در هسته وجود دارد. با وجود این که احتمال دارد قطعات مجزایی از نوکلئوتیدها در DNA نوسازی شوند، ولی کل ملکول در زمانی که همانندسازی نمی‌شود، از نظر متابولیکی خنثی است. از طرف دیگر، ملکول‌های RNA غیرضروری بوده و می‌توانند توسط انواع دارای همان ویژگی که جدیداً سنتز شده‌اند، جایگزین گردند. لذا تعجب‌آور نیست که سیستم‌های ترمیمی شناخته‌شده‌ای برای RNA وجود ندارد. در عوض، سلول‌ها ملکول‌های ناقص RNA را به نوکلئوتیدها تجزیه می‌کنند تا بتوانند دوباره از آنها برای تولید انواع جدید RNA استفاده کنند.

این وضعیت واضح‌ترین حالت برای انواع ملکول‌های mRNAای است که نسبتاً

ناپایدار می‌باشند. هرچند، حتی ملکول‌های RNAای که پایدار هستند، نوسازی می‌شوند؛ برای مثال، نیمه-عمر tRNA در کبد حدود ۵ روز است. ۳۰ ساعت یک نیمه-عمر نسبتاً طولانی برای یک mRNA پستانداران است.

تجزیه RNA هم در هسته و هم در سیتوپلاسم انجام می‌شود. در هسته، تجزیه دو عمل همپوشان دارد. اول، به‌عنوان کنترل کیفی عمل می‌کند، به‌طوری که از خروج ملکول‌های RNA حاصل از رونویسی یا پردازش غلط به‌خارج هسته ممانعت می‌شود. دوم، ملکول‌های RNA موجود در ذرات ریبونوکلئوپروتئینی، به‌خصوص طی چرخه سلولی، نوسازی می‌شوند. ملکول‌های RNA توسط یک آنزیم هسته‌ای کلاهک‌برداری شده و توسط **اگزوزوم**[1]، یک کمپلکس چندآنزیمی، در جهت ′۳ به ′۵ تجزیه می‌شود.

نوسازی RNA پیک سیتوپلاسمی با ترجمه جفت می‌شود

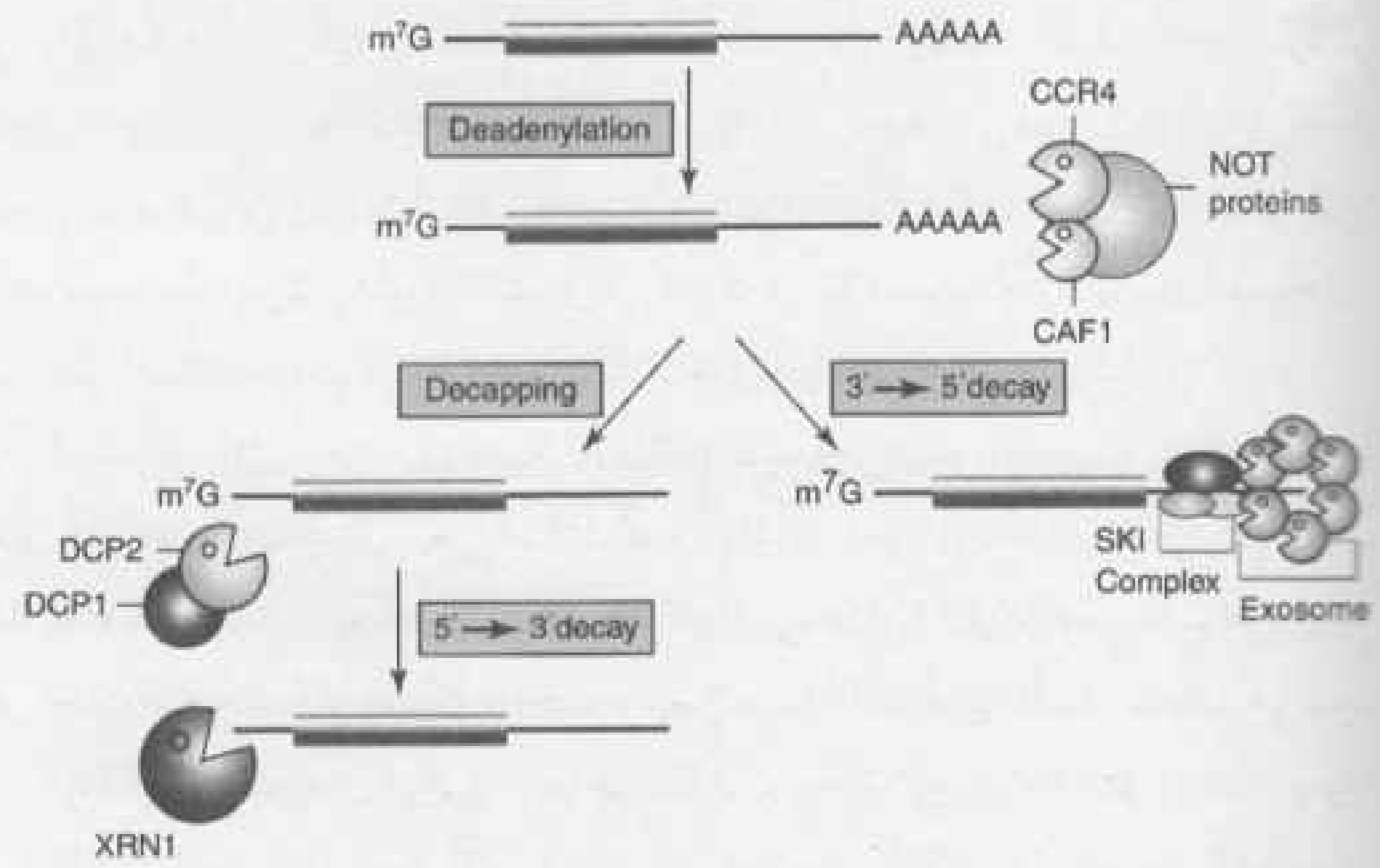
برداشت ملکول‌های RNA از سیتوپلاسم توسط ریبونوکلئازهای سلولی انجام می‌شود. ملکول‌های RNA پیک اساساً در داخل سیتوپلاسم تخریب می‌شوند. سرعت این تخریب در بین انواع مختلف ملکول‌های mRNA متفاوت است که احتمال کنترل به‌واسطه تجزیه متفاوت را افزایش می‌دهد.

دو مثال مربوط به نقش پایداری RNA در کنترل ژن تشریح می‌کند که چطور پایداری mRNA بر روی بیان ژن تأثیر می‌گذارد. توبولین جزء اصلی میکروتوبول‌های اسکلت اسکلتی بسیاری از انواع سلول‌ها است. وقتی میزان اضافی توبولین در داخل سلول وجود دارد، این پروتئین منومری به mRNA توبولین اتصال یافته و تخریب آن را تسریع و به موجب آن سبب کاهش سنتز توبولین می‌شود. مثال دوم مربوط به ویروس‌های هرپس سیمپلکس[2] (HSVs) می‌باشد که عامل زخم‌های سرد[3] و برخی عفونت‌های تناسلی است. توانایی HSV در ناپدارسازی تمامی ملکول‌های mRNA سلولی و در نتیجه کاهش رقابت برای ریبوزوم‌های آزاد، یکی از رخدادهای ابتدایی در عفونت با این ویروس است. از اینرو، ترجمه پروتئین‌های ویروسی به شکل مؤثرتری انجام می‌شود.

انواع مختلف **نوکلئازها** با ویژگی‌های متفاوت وجود دارند. در بهترین حالت این آنزیم‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند، یکی اگزونوکلئازها که mRNA را از انتهای ′۵ یا ′۳ تجزیه می‌کنند و دیگری آندونوکلئازها که پیوندهای فسفودی‌استری موجود در داخل یک ملکول را می‌شکنند. محصولات فعالیت RNase درانتهای ′۳ یا ′۵ فسفات دارند و براساس این که بعد از تجزیه منوفسفات در چه موقعیتی (′۳ یا ′۵) قرار دارد، هر دو گروه آندونوکلئازها و اگزونوکلئازها را می‌توان دسته‌بندی نمود.

پلی‌نوکلئوتید فسفریلاز فعالیت ′۵-′۳ اگزونوکلئازی دیگری است که در تجزیه RNA نقش دارد. مکانیسم تجزیه RNA توسط این آنزیم بر اساس به‌کارگیری فسفات معدنی

1. Exosome 2. Herpes simplex viruses 3. Cold sores



شکل ۱۹-۵ دو مسیر برای تخریب mRNA. هر دو مسیر با کوتاه‌شدن دم پلی (A) در mRNA آغاز می‌شوند. سپس mRNA دآدنیله با برداشت کلاهک و به‌دنبال آن تخریب ۵′ به ۳′ (چپ) یا مسیر ۳′ به ۵′ توسط اگزوزوم و کمپلکس SKI (راست) تجزیه می‌شود.

برای جایگزینی پیوند فسفودی‌استری انتهای ۳′ در RNA و در نتیجه تولید یک RNA کوتاه‌تر همراه با یک نوکلئوتید دی‌فسفات می‌باشد.

ساختمان RNA می‌تواند بر روی فعالیت نوکلئازی تأثیر بگذارد. اکثر ریبونوکلئازها در نواحی دارای ساختمان شدیداً منظم RNA، تأثیر کمتری دارند. بنابراین، ملکول‌های tRNA ترجیحاً در نواحی جفت‌نشده توالی شکسته می‌شوند و اگزوزوم سوبستراهای RNA فاقدساختمان[1] یا بدتاشده[2] را ترجیح می‌دهد. از طرف دیگر، بسیاری از RNaseها که در پردازش RNA نقش دارند، برای شناسایی نیازمند سوبسترایی با یک ساختمان سه‌-بُعدی مشخص هستند.

ملکول‌های mRNA سیتوپلاسمی می‌توانند توسط مسیرهای همپوشان متعددی تخریب گردند (شکل ۱۹-۵). ماشین تخریب mRNA معمولاً در اجسام P یافت می‌شوند که گرانول‌های تحت‌سلولی حاوی مجموعه‌ای از آنزیم‌های متابولیزه‌کننده mRNA، شامل انواع مربوط به تخریب، هستند. در اکثر موارد، دم ۳′ پلی (A) اساساً توسط هضم اگزو-نوکلئازی کوتاه می‌شود. این دآدنیلاسیون توسط پروتئین(های) اتصالی پلی (A) مهار می‌شود. سپس کلاهک توسط یک **آنزیم کلاهک‌بردار**[3] اختصاصی برداشت می‌گردد که توسط پروتئین اتصالی پلی (A) نیز مهار می‌شود. RNA فاقد کلاهک سوبسترایی برای یک ۳′ ← ۵′ اگزونوکلئازی است که RNA را به نوکلئوتیدها تجزیه می‌کند. مسیر دیگر مستلزم دآدنیلاسیون و تجزیه ۵′ ← ۳′ اگزونوکلئولیتیک توسط اگزوزوم‌های سیتوپلاسمی ملکول‌های mRNA تا رسیدن به کلاهک آنها می‌باشد (شکل ۱۹-۵).

زوال به‌واسطه کدون بی‌معنی سبب حذف ملکول‌های mRNAای می‌شود که قادر به تولید یک پروتئین کامل نیستند. هیچ چیز کامل نیست. در حالی که رونویسی و پردازش

1. Unstructured 2. Misfolded 3. Decapping enzyme

از انرژی سلولی برای کاهش اشتباه استفاده می‌کنند، ولی همچنان اشتباه وجود دارد. از آنجایی که هر ملکول **mRNA** به پروتئین‌های متعددی ترجمه می‌شود، **mRNA**ای که به شکل صحیحی پردازش نشده است، هم سبب اتلاف انرژی مورد نیاز برای ترجمه می‌شود و هم سبب تولید پروتئین‌های بدتاشده‌ای می‌گردد که می‌توانند سبب آغاز التهاب و آسیب‌های شدیدتر، همانند حالت مربوط به تولید پلاک‌های آمیلوئید در بیماری آلزایمر، گردند.

احتمال زیادی وجود دارد که یک **mRNA** بدپردازش‌شده یا بدرونویسی‌شده حاوی کدون‌های خاتمه زنجیر (بی‌معنی) باشند. کدون‌های بی‌معنی نارس سبب تحریک تخریب **mRNA** طی فرایندی به‌نام زوال به‌واسطه کدون بی‌معنی[1] (NMD) می‌شود. طی اولین دور (جاده‌صاف‌کنی) ترجمه، کدون خاتمه نارس توسط فاکتورهای خاتمه شناسایی می‌شود. این کمپلکس فاکتورهای دیگری را فرا می‌خواند که پیام تخریب **mRNA** را ارسال نموده و **mRNA** ناقص را به جسم P می‌فرستد. این مکانیسم مراقبتی می‌تواند بین کدون‌های بی‌معنی نارس و صحیح تمایز قائل شود، زیرا کدون‌های بی‌معنی نارس در فرادست (′5) محل‌های اتصال اینترون - اگزون **mRNA** قرار دارند.

واژه‌های کلیدی

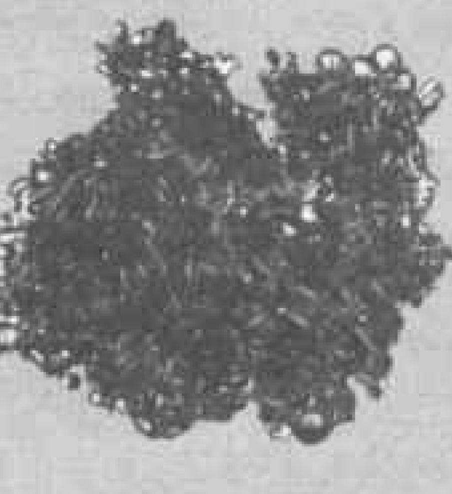
شروع	طویل‌سازی	اینترون	اسپلایسینگ آلترناتیو
پروموتر	خاتمه	پردازش RNA	کدون خاتمه زنجیر
پردازش RNA	فاکتور رونویسی	اگزون	(miRNA) microRNA
رونوشت	استیلاسیون هیستون	ایجاد کلاهک	RNA کوچک مهاری (siRNA)
RNA پلیمراز	فزاینده	دومن انتهای کربوکسیل RNA پلیمراز	اگزوزوم
RNA پلیمراز I	فراخوانی	snRNP	برداشت کلاهک
RNA پلیمراز II	عملکرد-سیس	اسپلایسئوزوم	
RNA پلیمراز III	هولوآنزیم RNA پلیمراز	کمند	
الگو	فاکتور سیگما	پلی‌آدنیلاسیون	

1. Nonsense-mediated decay



۶

سنتز پروتئین: ترجمه و تغییرات بعد از ترجمه



ارتباطات بالینی

مفاهیم کلیدی

- بیوسنتز پروتئین مستلزم ترجمه زبان ژن‌ها به زبان پروتئین‌ها است.
- توالی‌های سه‌نوکلئوتیدی (کدون‌های) موجود در mRNA، اسیدهای آمینه، نقطه شروع ترجمه و خاتمه زنجیر پروتئینی را تعیین می‌کنند. ۶۴کدون احتمالی وجود دارد و بیشتر آمینو اسیدها با بیش از یک کدون مشخص می‌گردند. کد ژنتیکی را انحطاطی گویند و تقریباً همگانی است.
- ترجمه بر روی RNA متمرکز است: mRNA اطلاعات ژنتیکی را انتقال می‌دهد، tRNA اسیدهای آمینه را منتقل می‌کند و rRNA به شکل‌گیری ریبوزوم و کاتالیز تولید پیوند پپتیدی کمک می‌کند. پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و عوامل متعددی در سنتز پروتئین دخالت دارند.
- سنتز در جهت انتهای آمینو به کربوکسیل است. در هر مرحله، (۱) اسید

آمینه مناسب با اتصال به یک tRNA فعال می‌شود، (۲) aa-tRNA در جایگاه گیرنده ریبوزوم قرار می‌گیرد، (۳) زنجیر پپتیدی تازه‌ساز توسط پپتیدیل ترانسفراز با اسید آمینه جدید جفت می‌شود، و (۴) tRNA حاوی پپتیدیل امتدادیافته به جایگاه دهنده ریبوزوم جا به جا می‌شود.

- ترجمه هم به‌طور کلی و هم بر روی پروتئین‌های خاص، تحت کنترل شدید قرار دارد. تغییر بعد از ترجمه و همراه با ترجمه پروتئین‌ها معمول بوده و می‌تواند بر روی شکل، عملکرد، موقعیت سلولی، انتقال به خارج سلول و عمر پروتئین تأثیر بگذارد.
- تاشدن یک پروتئین به کونفورماسیون نهایی آنها به‌طور خودبه‌خوی و یا به کمک پروتئین‌های چاپرون انجام می‌شود.
- مکانیسم‌هایی برای تخریب پروتئین‌هایی وجود دارد که دیگر نیازی به آنها نیست، بدتا شده‌اند، آسیب دیده‌اند و یا ناقص هستند. پروتئازوم یک مرکز تخریب مهم ولی نه منحصر است.

۶-۱ • مقدمه

بیوسنتز پروتئین را **ترجمه**[1] گویند، زیرا طی این فرایند ترجمه بیوشیمیایی اطلاعات ژنتیکی که به‌صورت زبان چهار حرفی DNA ذخیره و انتقال داده می‌شود، به زبان ۲۰ حرفی پروتئین‌ها صورت می‌پذیرد. ترجمه بر روی چند فعالیت RNA متمرکز می‌باشد: RNA پیک اطلاعات ژنتیکی را انتقال می‌دهد، RNA ناقل اسیدهای آمینه را انتقال داده و این پیام را رمزگشایی می‌کند، RNA ریبوزومی تولید پیوند پپتیدی را کاتالیز نموده و محل اصلی همایش را فراهم می‌سازد، و ملکول‌های RNA بسیار کوچک تنظیم‌کننده‌های مهم این فرایند هستند.

سلول‌ها از نظر نیاز و توانایی خود برای سنتز پروتئین‌ها با یکدیگر اختلاف دارند. گلبول‌های قرمز خون که به تمایز نهایی رسیده‌اند، فاقد دستگاه ترجمه هستند و طول عمر آنها تنها ۱۲۰ روز است. سلول‌های دیگر پروتئین‌هایی را سنتز می‌کنند که برای حفظ غلظت آنزیم‌ها و سایر پروتئین‌ها به آنها نیاز دارند. سلول‌های در حال رشد و تقسیم می‌بایست مقادیر بسیار بیشتری پروتئین را سنتز کنند و برخی سلول‌ها همچنین پروتئین‌هایی را برای انتقال به خارج سلول تولید می‌کنند. برای مثال، سلول‌های کبدی کارخانه‌های پروتئینی هستند که آنزیم‌های مورد استفاده در مسیرهای متابولیکی متعدد را به همراه پروتئین‌هایی برای انتقال به خارج سلول، برای مثال آلبومین سرمی به عنوان پروتئین اصلی پلاسمای خون، سنتز می‌کنند.

۶-۲ • اجزاء دستگاه ترجمه

RNA پیک اطلاعات کدشده در DNA را منتقل می‌کند

اطلاعات ژنتیکی به‌صورت توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در DNA به ارث رسیده و ذخیره می‌شوند. بیان انتخابی این اطلاعات نیاز به رونویسی آن به mRNAای دارد که یک پیام اختصاصی و دقیق را از «بانک اطلاعاتی» موجود در هسته به محل سیتوپلاسمی سنتز پروتئین انتقال می‌دهد.

در اوکاریوت‌ها ملکول‌های mRNA معمولاً به صورت ملکول‌های پیش‌ساز بزرگتری

1. Translation

سنتز می‌شوند که قبل از انتقال به خارج هسته پردازش می‌گردند (ص ۲۷۱). mRNA اوکاریوتی تقریباً همیشه **منوسیسترونی**[1] است؛ یعنی، تنها یک پلی‌پپتید را کد می‌کند. انتهای ′۵ با **۷-متیل‌گوانوزینی** کلاهک‌دار می‌شود که از طریق یک پل ′۵-تری‌فسفاتی به انتهای ′۵ ملکول mRNA اتصال دارد (ص ۲۷۲). یک ناحیه ′۵-ترجمه‌نشونده قبل از **پیام شروع** ترجمه قرار دارد. معمولاً، ولی نه همیشه، این پیام اولین توالی AUG‌ای است که در هنگام خواندن پیام در جهت ′۳←′۵ مشاهده می‌گردد. توالی‌های کدونی سه-نوکلئوتیدی غیرمنقطع که یک توالی پلی‌پپتیدی منحصر را مشخص می‌کند، به‌دنبال **کدون شروع** آمده تا اینکه به یک کدون خاتمه برسد. در ادامه یک توالی ′۳-ترجمه‌نشونده[2] (یا UTR)، معمولاً به طول حدود ۱۰۰ نوکلئوتید، قبل از خاتمه mRNA با یک دم پلی‌آدنیلاتی به طول ۲۰۰-۱۰۰ نوکلئوتید، وجود دارد.

mRNA پروکاریوتی تفاوت قابل‌توجهی دارد. انتهای ′۵ فاقد کلاهک است، ولی از زمان سنتز خود توسط RNA پلیمراز، یک تری‌فسفات انتهایی را نگه داشته است. اکثر ملکول‌های mRNA پلی‌سیسترونی هستند؛ چندین پلی‌پپتید را کد می‌کنند و بیش از یک کدون شروع AUG دارند. یک توالی قرارگیری-ریبوزوم تقریباً ۱۰ نوکلئوتید در فرادست یک کدون شروع AUG قرار دارد. به‌دنبال پیام خاتمه، یک UTR وجود دارد، ولی دم پلی‌آدنیلات وجود ندارد.

RNA ناقل یک ملکول مترجم دوزبانی است

تمامی ملکول‌های tRNA دارای مشخصات ساختمانی مشترک متعددی، شامل توالی CCA-انتهای ′۳ که به آن اسید آمینه اتصال می‌یابد، یک ساختمان دوم «برگ شبدری» حفظ‌شده و یک ساختمان سوم L-شکل (ص ۸۹)، هستند. هر چند، هر کدام از این انواع متعدد tRNA یک توالی نوکلئوتیدی بی‌همتا دارند که امکان تعامل بسیار اختصاصی با mRNA و آمینوآسیل tRNA سنتتازی را فراهم می‌سازد که اسید آمینه اختصاصی را به آن متصل می‌کند.

کد ژنتیکی از الفبای چهار حرفی نوکلئوتیدها استفاده می‌کند

اطلاعات ژنتیکی به صورت توالی‌های خطی از نوکلئوتیدهای موجود در DNA وجود دارند که مشابه توالی خطی از حروف موجود در این کلمات است. زبان DNA از **الفبای چهار-حرفی** متشکل از دو پورین، A و G (آدنین و گوانین)، و دو پیریمیدین، C و T (سیتوزین و تیمین)، بهره می‌برد. اطلاعات موجود در DNA به‌طور انتخابی به ملکول mRNA‌ای رونویسی می‌شود که الفبای چهار-حرفی مشابهی دارد، به غیر از این که U (اوراسیل) جایگزین T شده است. لذا زبان RNA لهجه‌ای از زبان ژنتیکی DNA است. اطلاعات ژنتیکی اکثراً

1. Monocistronic
2. 3′ - Untranslated sequence

به شکل پروتئین‌هایی **بیان می‌شوند** که خصوصیات خود را از توالی اسید آمینه‌ای خود می‌گیرند. در بیوسنتز پروتئین، زبان چهار حرفی اسیدهای نوکلئیک به زبان ۲۰ حرفی پروتئین‌ها **ترجمه می‌شود**. در مقایسه با زبان، جهت این توالی‌ها مشخص می‌باشد. به‌طور قراردادی، توالی‌های اسید نوکلئیک در جهت $5' \rightarrow 3'$ و توالی‌های پروتئینی از انتهای آمینو به انتهای کربوکسیل نوشته می‌شوند. این جهت‌ها از نظر معانی خواندن و بیوسنتتیک با یکدیگر مرتبط هستند.

کدون‌های موجود در mRNA، کلمات سه-حرفی هستند

ارتباط ۱:۱ بازها به اسیدهای آمینه امکان کدنمودن تنها چهار اسید آمینه مختلف را فراهم می‌سازد، در حالی‌که ارتباط ۲:۱ تعداد $16 = 4^2$ اسید آمینه را کد می‌کند. هیچکدام از اینها کافی نمی‌باشد، زیرا در اکثر پروتئین‌ها ۲۰ اسید آمینه مختلف وجود دارند. کد ژنتیکی سه-حرفی دارای $64 = 4^3$ کلمه است؛ این میزان برای مشخص‌سازی پیام‌های شروع و خاتمه نیز کافی است که معادل نقطه‌گذاری[1] می‌باشد. این کلمات سه-حرفی را **کدون** گویند و در جدول ۱-۶ نشان داده شده‌اند. دو اسید آمینه توسط تنها یک کدون مشخص می‌گردند: متیونین توسط AUG و تریپتوفان توسط UGG. بقیه توسط دو، سه، چهار یا شش کدون مشخص می‌شوند. کدون‌های متعدد برای یک اسید آمینه نشانه‌ای از **انحطاط**[2]

جدول ۱-۶ • کد ژنتیکی[1]

5' Base		U	C	A	G	3' Base
	U	UUU, UUC: Phe UUA, UUG: Leu	UCU, UCC, UCA, UCG: Ser	UAU, UAC: Tyr UAA, UAG: Stop	UGU, UGC: Cys UGA: Stop UGG: Trp	U C A G
	C	CUU, CUC, CUA, CUG: Leu	CCU, CCC, CCA, CCG: Pro	CAU, CAC: His CAA, CAG: Gln	CGU, CGC, CGA, CGG: Arg	U C A G
	A	AUU, AUC, AUA: Ile AUG: Met	ACU, ACC, ACA, ACG: Thr	AAU, AAC: Asn AAA, AAG: Lys	AGU, AGC: Ser AGA, AGG: Arg	U C A G
	G	GUU, GUC, GUA, GUG: Val	GCU, GCC, GCA, GCG: Ala	GAU, GAC: Asp GAA, GAG: Glu	GGU, GGC, GGA, GGG: Gly	U C A G

[1] کد ژنتیکی شامل ۶۴ کدون است که حاصل ترکیب‌های سه‌تایی از چهار باز مختلف می‌باشند. به اهمیت توالی توجه کنید: سه باز که هر کدام یک بار در هر کدون سه‌تایی به‌کار روند، شش حالت را بوجود می‌آورند: ACG، AGC، GAC، GCA، CAG و CGA که به ترتیب برای ترئونین، سرین، آسپارتات، آلانین، گلوتامین و آرژینین می‌باشند.

1. Punctutation 2. Degeneracy

کد ژنتیکی می‌باشد. کد ژنتیکی تقریباً **عمومی** است، زیرا در تمامی موجودات از کلمات رمز یکسانی استفاده می‌شود. یکی از موارد استثناء همگانی بودن، میتوکندری است که در آن چند کدون معنی متفاوتی نسبت به معنی مورد استفاده در سیتوزول همان موجود زنده دارد (جدول ۲-۶).

جدول ۲-۶ • کاربرد غیرهمگانی کدون در میتوکندری پستانداران

کدون	کد معمول	کدمیتوکندریایی
UGA	خاتمه	تریپتوفان
AUA	ایزولوسین	میتونین
AGA	آرژینین	خاتمه
AGG	آرژینین	خاتمه

نقطه‌گذاری

چهار کدون به‌طور نسبی یا کامل نقش نقطه‌گذاری دارند. **پیام شروع**، **AUG**، متیونین را نیز مشخص می‌کند. یک AUG در محل مناسبی از mRNA مشخص‌کننده متیونین به‌عنوان ریشه انتهای آمینوی شروع‌کننده می‌باشد. کدون‌های AUG بعدی موجود در mRNA، ریشه‌های متیونین را در داخل پروتئین مشخص می‌کنند. سه کدون UAG، UAA و UGA، **پیام‌های توقفی** هستند که هیچ اسید آمینه‌ای را مشخص نکرده و **کدون‌های خاتمه**، یا با مناسبت کمتر، **کدون‌های بی‌معنی** هستند.

کدون UGA عملکرد دیگری را به‌عنوان کدکننده **سلنوسیستئین** (sec) در حداقل ۲۵ پروتئین انسانی دارد. **سلنوسیستئینیل-tRNA** از یک سریل - $tRNA^{(sec)ser}$ اختصاصی سنتز می‌شود (یک نگاه دقیق‌تر ۱-۶) و سلنوسیستئین تنها زمانی در داخل زنجیر پلی‌پپتیدی قرار داده می‌شود که کدون UGA در یک توالی الحاق-sec[1] قرار داشته باشد که خود یک ساختمان ساقه-قوس تعریف‌شده در ساختمان mRNA می‌باشد. یک فاکتور طویل‌سازی اختصاصی (eEFSec) و یک پروتئین اتصالی الحاق سلنوسیستئین[2] (SBP2) نیز مورد نیاز می‌باشد.

تعاملات کدون-آنتی‌کدون امکان خواندن mRNA را فراهم می‌سازد

ترجمه کدون‌های mRNA مستلزم تعامل آنها با توالی‌های آنتی‌کدون مکمل موجود در tRNA است. هر گونه tRNA یک اسید آمینه خاص را حمل نموده و یک توالی سه‌حرفی

یک نگاه دقیق‌تر ۱-۶

آمینو آسیل tRNA سنتتازها

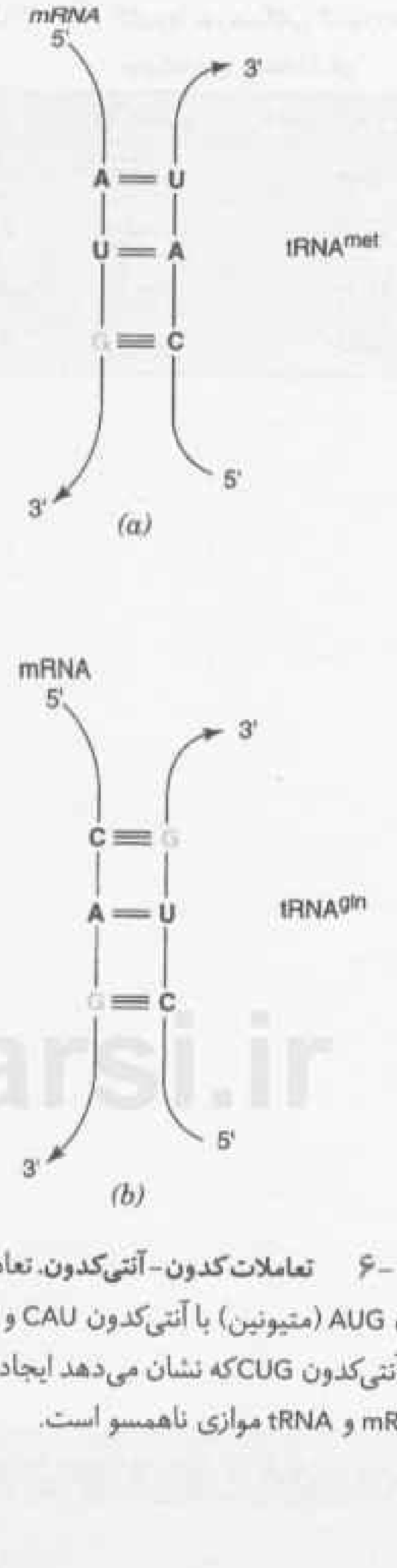
انتظار می‌رود که اوکاریوت‌ها و برخی باکتری‌ها ۲۰ آمینوآسیل -tRNA سنتتاز داشته باشند، ولی بسیاری از پروکاریوت‌ها و آرکی‌ها فاقد گلوتامینیل-، آسپاراژینیل-، و گاهی سیستئینیل -tRNA سنتتازها هستند. در عوض، این ملکول‌های tRNA به‌طور غیرمستقیم تولید می‌شوند. اینها ابتدا توسط آمینوآسیل -tRNA سنتتازهای دارای ویژگی کم برای شناسایی ملکول‌های tRNA خود با گلوتامات، آسپارتات یا O- فسفوسرین آمینوآسیله می‌شوند. سپس اسیدهای آمینه اتصال‌یافته توسط آنزیم‌های تغییردهنده وابسته به آمینوآسیل -tRNA که تنها آمینوآسیل - tRNA مناسب را شناسایی می‌کنند، تبدیل می‌گردند.

سلنوسیستئین طی یک فرایند دو مرحله‌ای از سریل - $tRNA^{Sec}$ سنتز می‌شود؛ ابتدا سرین توسط یک کیناز فسفریله شده و سپس توسط سنتازی که از سلنوفسفات استفاده می‌کند، به سلنوسیستئین تبدیل می‌گردد. بسیاری از پروتئین‌های حاوی سلنوسیستئین، نقش آنتی‌اکسیدانی در حذف گونه‌های واکنشگر اکسیژن دارند و حذف ژن سریل - $tRNA^{Sec}$ کشنده است.

1. sec-Insertion
2. Selenocysteine insertion binding protein

آنتی‌کدونی اختصاصی دارد. همانند ایجاد جفت باز در DNA، همان‌طورکه در شکل ۱-۶ نشان داده شده است، ایجاد جفت باز آنتی‌کدون-کدون از نوع **موازی ناهمسو** می‌باشد. کدون‌ها در یک **قالب خواندن غیرهمپوشان، متوالی** خوانده می‌شوند. آنتی‌کدون و جایگاه‌های اسید آمینه-گیرنده در دو انتهای مخالف ملکول L-شکل tRNA قرار دارند (ص ۸۹). از هر دو نظر تصوری و فیزیکی، tRNA بر روی شکاف بین توالی نوکلئوتیدی mRNA متصل به ریبوزوم و جایگاه همایش پروتئین بر روی ریبوزوم پل می‌زند.

از آنجایی که ۶۱ کدون ۲۰ اسید آمینه را مشخص می‌کنند، احتمالاً لازم به نظر می‌رسد که دقیقاً ۶۱ گونه tRNA مختلف وجود داشته باشد. ولی این‌طور نیست. بسیاری از اسیدهای آمینه توسط بیش از یک نوع tRNA حمل می‌شوند، ولی ایجاد جفت باز متفاوت از جفت باز استاندارد نیز در تعاملات کدون-آنتی‌کدون شایع می‌باشد. بسیاری از کدون‌های انحطاطی می‌توانند توسط بیش از یک ملکول tRNA (ولی همیشه توسط نوعی که اسید آمینه صحیح را حمل می‌کند) شناسایی شوند. یکی از نوکلئوتیدهایی که اغلب دیده می‌شود، اسید اینوزینیک (I)، نوکلئوتید مربوط به هیپوگزانتین، است که با U ،C و A ایجاد جفت باز می‌کند. نوکلئوتیدهای تغییریافته موجود در یا کنار نوکلئوتید آنتی‌کدون موجود در بسیاری از انواع ملکول‌های tRNA نیز تعاملات کدون-آنتی‌کدون را تعدیل می‌کنند. **فرضیه لغزش**[1] امکان ایجاد جفت باز با سختی کمتر را بین اولین موقعیت آنتی‌کدون و موقعیت **انحطاطی** (سوم) کدون را فراهم می‌سازد. قواعد ایجاد جفت باز در جدول ۳-۶ نشان داده شده است. در صورتی که از قواعد لغزش استفاده شود، آنگاه ۶۱ کدون فاقد نقطه‌گذاری، می‌توانند توسط حداقل ۳۱ ملکول tRNA مورد شناسایی قرار گیرند، ولی اکثر سلول‌ها حداقل ۵۰ نوع tRNA دارند. خوانش برخی کدون‌ها توسط یک آنتی‌کدون، کارامدتر از بقیه است. تمامی کدون‌ها یا جفت‌های کدونی معمولاً به‌طور برابر مورد استفاده قرار نمی‌گیرند؛ برخی از آنها به ندرت استفاده می‌شوند. بررسی بسیاری از توالی‌های متعدد mRNA نشان می‌دهد که ارگانیسم‌های مختلف به‌طور ترجیحی کدون‌های متفاوتی را برای تولید توالی‌های پلی‌پپتیدی مشابه استفاده می‌کنند.



شکل ۱-۶ تعاملات کدون-آنتی‌کدون. تعاملات بین (a) کدون AUG (متیونین) با آنتی‌کدون CAU و (b) کدون CAG با آنتی‌کدون CUG که نشان می‌دهد ایجاد جفت باز بین mRNA و tRNA موازی ناهمسو است.

«تجزیه» کد ژنتیکی

کد ژنتیکی (جدول ۱-۶ را ببینید) قبل از فراهم‌سازی امکان تعیین توالی DNA یا RNA، تعیین شد. در آزمایش‌های تجزیه-کد[2] از ملکول‌های mRNA ساختگی ساده برای فراهم‌سازی دیدگاه‌هایی در خصوص نحوه کدنمودن پروتئین‌ها استفاده شد.

پلی‌نوکلئوتید فسفریلاز واکنش غیروابسته به الگو را کاتالیز می‌کند. که در آن NDP

$$x\text{NDP} \leftrightarrow \text{polynucleotide}(\text{pN})_x + x\text{P}_i$$

می‌تواند هر ′۵-نوکلئوزید دی‌فسفاتی باشد. با استفاده از UDP، پلیمری از U، یا پلی (U)،

جدول ۳-۶ • قواعد ایجاد جفت باز لرزان

باز ′۳ کدون	بازهای احتمالی ′۵
A	U or I
C	G or I
G	C or U
U	A or G or I

1. Wobble hypothesis 2. Code-breaking

تولید می‌شود. سنتز پروتئین در آزمایشگاه با استفاده از پلی (U) به‌عنوان mRNA همراه با تولید پلی‌فنیل‌آلانین می‌باشد. به‌طور مشابه، پلی (A) و پلی (C) به‌ترتیب تولید پلی‌لیزین و پلی‌پرولین می‌کنند. ملکول mRNA با یک توالی تصادفی حاوی تنها U و C منجر به تولید پلی‌پپتیدهایی می‌شود که نه تنها حاوی پرولین و فنیل‌آلانین قابل پیش‌بینی هستند، بلکه سرین (از UCU و UCC) و لوسین (از CUU و CUC) را نیز تولید می‌کنند. انحطاط در کدون‌ها و همچنین پیچیدگی محصولات سبب شد تا تفسیر آزمایش‌های مربوط به ملکول‌های mRNA دارای توالی تصادفی مشکل شود، ولی ملکول‌های mRNA دارای توالی مشخص را می‌توان از ملکول‌های DNA ساختگی تکراری ساده رونویسی نمود. لذا پلی (AU) که از پلی (dAT) تکراری رونویسی می‌شود، تنها تولید کوپلیمری از Ile-Tyr-Ile-Tyr حاصل خواندن از روی توالی تکراری AUA UAU AUA UAU، می‌کند، و غیره. پلی (CUG) حاوی کدون‌های احتمالی CUG برای Leu، UGC برای Cys، و GCU برای Ala می‌باشد که در هنگام تنظیم این **قالب خواندن**، هر کدام از آنها تکرار می‌شود. در این آزمایش‌ها، شروع به‌صورت اتفاقی رخ می‌دهد، لذا سه هُموپلی‌پپتید تولید می‌شود: پلی‌لوسین، پلی-سیستئین و پلی‌آلانین. نقطه شروع هر چه باشد، پلی (CUCG) تولید پلی‌پپتیدی با توالی (-Leu-Ala-Arg-Ser-) می‌کند. این ارتباطات که در جدول ۴-۶ خلاصه شده‌اند، نشان می‌دهند که سه‌حرفی‌ها با یک توالی دقیق، بدون همپوشانی یا حذفی، خوانده می‌شود.

در آزمایش‌های دیگر از کدون‌های سه‌نوکلئوتیدی ساختگی به‌عنوان پیام‌های حداقل استفاده شد. هیچ پروتئینی ساخته نشد، ولی اتصال یک اسید آمینه به ریبوزوم (به صورت tRNA مربوطه) توسط یک کدون خاص تحریک شد. بعدها معنی هر کدون احتمالی با تعیین توالی‌های mRNA تصدیق شد.

جهش‌ها

شناخت کد ژنتیکی و نحوه خواندن آن، اساس شناخت ماهیت جهش‌ها را فراهم ساخت. به زبان ساده، جهش یک تغییر قابل‌وراثت در یک ژن است. **جهش‌های نقطه‌ای**[1] مستلزم

جدول ۴-۶ • محصولات پلی‌پپتیدی ملکول‌های mRNA سنتتیک[1]

mRNA	توالی کدون	محصولات
—$(AU)_n$—	—AUA UAU AUA UAU—	—$(Ile\text{-}Tyr)_{n/3}$—
—$(CUG)_n$—	—CUG CUG CUG CUG—	—$(Leu)_n$—
	—UGC UGC UGC UGC—	—$(Cys)_n$—
	—GCU GCU GCU GCU—	—$(Ala)_n$—
—$(CUCG)_n$—	CUC GCU CGC UCG	—$(Leu\text{-}Ala\text{-}Arg\text{-}Ser)_{n/3}$—

[1] کروشه‌های افقی تأکیدی بر قالب خواندن هستند.

1. Point mutations

ارتباط بالینی ۱-۶

جهش‌های خاموش ممکن است خاموش نباشند: (۱) سندروم پیری زودرس هاچینسون-گیلفورد و (۲) ژن مقاومت چنددارویی ۱

چندشکلی تک نوکلئوتیدی که در آن یک نوکلئوتید نسبت به ژن طبیعی تغییر دارد، را می‌توان با آنالیز DNA مورد جستجو قرار داد. وقتی چندشکلی در ناحیه کدکننده ژن سبب تغییر اسید آمینه کدشده توسط کدون تغییریافته نمی‌شود؛ به عنوان یک جهش خاموش در نظر گرفته می‌شود. با این وجود، ممکن است نتایج قابل‌توجهی وجود داشته باشد.

سندروم پیری زودرس هاچینسون-گیلفورد[1] یک ناهنجاری بسیار نادر است که با افزایش سن فوق‌العاده زودرس مشخص می‌شود؛ کودکان کوچک باقی مانده و از ریزش مو، کاهش شنوایی، پوکی استخوان، بیماری قلبی-عروقی، و سایر امراض سن بالا رنج می‌برند. اکثر مبتلایان به دلیل آنفارکتوس میوکارد در ابتدای جوانی می‌میرند. در ۹۰٪ موارد انتظار می‌رود تغییر از GGC به GGT در کدون ۶۰۸ ژن لامین A خاموش باشد، زیرا در هر صورت معنی کدون گلیسین است. هرچند، یک جایگاه اسپلایس پنهان فعال شده که نتیجه آن یک پروتئین لامین A با یک حذف داخلی ۵۰ اسید آمینه‌ای است که به شکل مناسبی پردازش نمی‌شود. لامین A جزئی از غشاء هسته است؛ پروتئین جهش‌یافته سبب ایجاد اختلال در این غشاء شده و به طریقی این بیماری را بوجود می‌آورد. از آنجایی که کودکان مبتلا به سن تولیدمثل نمی‌رسند، هر مورد حاصل جهش جدیدی دقیقاً در این نقطه از یک آلل این ژن می‌باشد.

ترکیب‌هایی از دو و سه جهش خاموش در ژن مقاومت چنددارویی ۱ (MDR1)[2] منجر به تولید پروتئین‌هایی با توالی طبیعی، ولی یک کونفورماسیون متفاوت و تعامل تغییریافته با دارو و مهارکننده می‌شود. این تغییر از کدون‌هایی که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند تا آنهایی که کمتر استفاده می‌شوند، سبب کاهش یا توقف ترجمه در ناحیه تحت‌تأثیر شده که نتیجه آن تغییر در تاشدن همزمان با ترجمه پروتئین می‌باشد. ارجحیت کدونی مورد استفاده به فراوانی استفاده از کدون‌های مجاوری بسط می‌یابد که همان توالی را مشخص می‌کنند. ژن‌های ساختگی که از جفت‌های کدونی نامساعد برای کد پروتئین کپسید پولیوویروس استفاده می‌کردند، حتی در زمانی که کدون‌های مجزا در کل مساعد بودند، با سرعت پایین ترجمه شدند.

1. Hutchinson-Gilford progeria syndrome
2. Multidrug resistance 1

تغییری در یک جفت باز در DNA و بنابراین یک باز در mRNA مربوطه می‌باشند. در صورتی که این تغییر در موقعیت سوم یک کدون انحطاطی رخ دهد، ممکن است تغییری را در نوع اسید آمینه مربوطه ایجاد نکند (برای مثال، UCC به UCA همچنان سرین را کد می‌کند). این نوع **جهش‌های خاموش**[1] معمولاً در هنگام مقایسه ژن‌های مربوط به پروتئین‌های مشابه، برای مثال هموگلوبین گونه‌های مختلف، مشاهده می‌گردند، لذا معمولاً تأثیری ندارند (یک مورد استثناء در ارتباط بالینی ۱-۶ آورده شده است.)

جهش‌های بدمعنی[2] از یک تغییر بازی به‌وجود می‌آیند که سبب قرارگیری یک اسید آمینه متفاوت در یک پروتئین می‌شود (ارتباط بالینی ۲-۶). جهش‌های نقطه‌ای همچنین می‌توانند سبب ایجاد یا از بین رفتن یک کدون خاتمه شوند و بنابراین طول یک پروتئین را تغییر می‌دهند. تولید یک کدون خاتمه از کدون کدکننده یک اسید آمینه، نوعی **جهش بی‌معنی**[3] است؛ این نوع جهش منجر به خاتمه زودرس و تولید یک پروتئین ناقص می‌شود (ارتباط بالینی ۳-۶). جهش یک کدون خاتمه به کدون مربوط به یک اسید آمینه، امکان ادامه خواندن پیام تا رسیدن به کدون خاتمه دیگر را فراهم می‌سازد. نتیجه یک پروتئین

1. Silent mutations 2. Missense mutations 3. Nonsense mutation

ارتباط بالینی ۲-۶

جهش‌های بدمعنی: هموگلوبینوپاتی‌ها

مهمترین جهش بدمعنی که بر روی ساختمان هموگلوبین تأثیر می‌گذارد، در کم‌خونی سلول داسی مشاهده می‌گردد (ارتباطات بالینی ۴-۲ و ۶-۹ را ببینید). یک تغییر از A به U در کدون GAA یا GAG مربوط به گلوتامات تولید کدون GUA یا GUG برای والین در موقعیت ششم زنجیر β می‌کند. هموگلوبین S(HbS) داکسیژنه پلیمرهای خطی ایجاد می‌کند که سبب می‌شود گلبول‌های قرمز در زمان کمبود اکسیژن، به شکل داس درآیند. درمان با هیدروکسی‌اوره سبب تحریک سنتز زنجیرهای γ و در نتیجه افزایش میزان هموگلوبین جنینی می‌شود؛ HbF با پلیمریزاسیون HbS تداخل می‌کند. بیماری هموگلوبین C هموگلوبینوپاتی معمول دیگری است که در آن یک تغییر از G به A در کدون GAA یا GAG مربوط به گلوتامات وجود دارد که نتیجه آن کدون AAA یا AAG برای لیزین در موقعیت ششم گلوبین β می‌باشد. صدها جهش بدمعنی دیگر در هموگلوبین شناخته شده است.

ارتباط بالینی ۳-۶

جهش‌های تولیدکننده کدون خاتمه

در هموگلوبین McKees Rocks (OMIM۱۴۱۹۰۰) کدون UAU یا UAC که به‌طور طبیعی تیروزین را در موقعیت ۱۴۵ گلوبین β مشخص می‌کند، دچار جهش به کدون خاتمه UAA یا UAG می‌شود. نتیجه کوتاه‌شدن گلوبین β از ۱۴۶ ریشه به ۱۴۴ ریشه می‌باشد. اتصال ۳،۲-بیس‌فسفوگلیسرات مختل شده و تمایل هموگلوبین جهش‌یافته برای اکسیژن به‌طور غیرمعمول بالا بوده و سبب کاهش تحویل اکسیژن می‌شود. در پاسخ به این حالت، اریتروپویتین توسط ترشح کلیه شده و افزایش تولید گلبول‌های قرمز خون سبب ایجاد فنوتیپ پلی‌سیتمیک می‌شود.

جهش خاتمه‌دهنده دیگر، نوعی β تالاسمی را ایجاد می‌کند. تالاسمی‌ها با عدم تعادل بین استوکیومتری سنتز گلوبین α و β به‌وجود می‌آید. گلوبین β در β^0 تالاسمی سنتز نمی‌شود. در نتیجه، گلوبین α که نمی‌تواند برای تولید هموگلوبین به گلوبلین β اتصال یابد، انباشته شده و در سلول‌های اریتروئید رسوب می‌کند. این رسوب سبب آسیب غشاء سلولی و در نتیجه کم‌خونی همولیتیک و تحریک اریتروپوئز می‌شود. یکی از انواع β^0 تالاسمی که در آسیای جنوب شرقی شایع است، نتیجه یک جهش خاتمه‌دهنده در کدون ۱۷ گلوبین β می‌باشد؛ کدون طبیعی AAG که ریشه لیزیل را مشخص می‌کند، به کدون توقف UAG تبدیل می‌شود؛ هیچ توالی مفیدی از گلوبین β سنتز نشده و گلوبین β وجود ندارد. میزان mRNA مربوط به گلوبین β نیز کاهش می‌یابد که احتمالاً از طریق فرایندی به‌نام زوال به‌واسطه-بی‌معنی[1] می‌باشد.

1. Nonsense-mediated decay

بزرگتر از حد طبیعی است. این پدیده اساس چندین ناهنجاری می‌باشد (جدول ۵-۶ و ارتباط بالینی ۴-۶).

الحاق[1] یا حذف[2] یک نوکلئوتید در داخل ناحیه کدکننده یک ژن منجر به یک **جهش تغییرقالب**[3] می‌شود. قالب خواندن در آن نقطه و کدون‌های بعدی، در چهارچوب جدید خوانده شده تا به یک کدون خاتمه برسد. جدول ۶-۶ این پدیده را تشرح می‌کند. اهمیت انتخاب قالب خواندن در برخی ویروس‌های بسیار کوچکی مورد توجه قرار دارد که در آنها اندازه کوچک ویروس سبب محدودیت میزان DNA موجود در آن می‌شود. برای جبران این محدودیت، یک قطعه DNA پلی‌پپتیدهای متفاوتی را کد می‌کند که حاصل ترجمه

1. Insertion 2. Deletion 3. Frameshift mutation

جدول ۵-۶ • جهش‌های «خواندن و رفتن» در کدون‌های خاتمه سبب تولید زنجیرهای گلوبین α با اندازه بلند غیرطبیعی می‌شوند

هموگلوبین	کدون ۱۴۲ در α	اسید آمینه ۱۴۲	طول گلوبین α (تعداد ریشه‌ها)
A	UAA		۱۴۱
Constant Spring	CAA	Glutamine	۱۷۲
Icaria	AAA	Lysine	۱۷۲
Seal Rock	GAA	Glutamate	۱۷۲
Koya Dora	UCA	Serine	۱۷۲

ارتباط بالینی ۴-۶

α- تالاسمی‌ها

بر روی هر کروموزوم ۱۶ دو ژن گلوبین α بیان می‌شود. در بسیاری از موارد α-تالاسمی حاصل حذف دو، سه یا تمامی چهار ژن گلوبین α می‌باشد؛ با افزایش تعداد ژن‌های حذف‌شده، شدت عوارض بالینی بیشتر می‌شود. برعکس، ناهنجاری‌هایی که در جدول ۵-۶ خلاصه شده‌اند، اشکالی از α- تالاسمی‌ها هستند که در آنها طول ملکول‌های گلوبین α بیش از حد طبیعی است. این گلوبین‌ها جایگزین گلوبین α می‌شوند و تنها به مقادیر کم وجود دارند، زیرا سرعت سنتز آنها پایین است و یا به احتمال بیشتر، سرعت تجزیه این گلوبین‌های α غیرطبیعی بیشتر است. کدون توقف طبیعی UAA به یکی از چهار کدون معنی جهش پیدا می‌کند که نتیجه آن قرارگیری چهار اسید آمینه مختلف در موقعیت ۱۴۲ می‌باشد. گلوبین α طبیعی ۱۴۱ ریشه طول دارد، ولی طول این گلوبین‌های α غیرطبیعی برابر ۱۷۲ ریشه می‌باشد، زیرا یک توالی سه‌نوکلئوتیدی که در ناحیه ترجمه‌نشونده طبیعی این mRNA وجود دارد، به کدون خاتمه در موقعیت ۱۷۳ تبدیل می‌شود. زنجیرهای گلوبینی بلندتر همچنین می‌توانند حاصل جهش‌های تغییر قالب یا الحاق‌ها باشند.

جدول ۶-۶ • یک جهش تغییر قالب تولید هموگلوبین Wayne می‌کند[1]

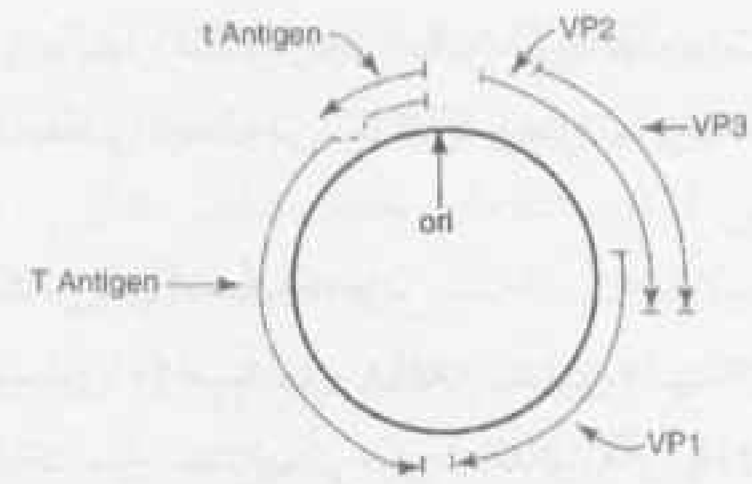
موقعیت	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147
توالی اسیدآمینه‌ای گلوبین – α طبیعی	-Thr	-Ser	-Lys	-Tyr	-Arg						
توالی کدونی گلوبین – α طبیعی	-ACP	-UCU	-AAA	-UAC	-CGU	-[UAA]	-GCU	-GGA	-GCC	-UCG	-GUA
توالی کدونی گلوبین – α طبیعی	/	//	//	//	//	//	//	//	//	//	/
توالی کدونی گلوبین – α در هموگلوبین Wayne	-ACP	-UCA	-AAU	-ACC	-GUU	-AAG	-CUG	-GAG	-CCU	-CGG	-[UAG]
توالی اسیدآمینه‌ای گلوبین – α در هموگلوبین Wayne	-Thr	-Ser	-Asn	-Thr	-Val	-Lys	-Leu	-Glu	-Pro	-Arg	

[1] حذف‌بازی که سبب تغییر قالب‌خواندن می‌شود، با دایره مشخص شده است. کدون‌های خاتمه در داخل کادر قرار دارند.

از قالب‌های خواندن متفاوت هستند. ویروس میمونی تولیدکننده-تومور SV40، نمونه‌ای از این موارد است (شکل ۲-۶). HIV و برخی ویروس‌های دیگر برای تولید پروتئین‌های مختلف از یک پیام، وابسته به تغییر قالب در هنگام ترجمه هستند (ارتباط بالینی ۵-۶).

آمینوآسیلاسیون RNA ناقل، اسیدهای آمینه را برای سنتز پروتئین فعال می‌کنند

قبل از این که اسیدهای آمینه بتوانند در داخل پروتئین‌ها قرار گیرند، لازم است از طریق



شکل ۲-۶ ژنوم ویروس میمونی ۴۰ (SV40). SV40 DNA با رنگ قرمز نشان داده شده است که یک حلقه دو-رشته با قدری بیش ۵۰۰۰ جفت باز است و تمامی اطلاعات مورد نیاز برای بقاء و همانندسازی ویروس در یک سلول میزبان راکد می‌کند. این ژنوم استفاده فوق‌العاده مؤثر پتانسیل کدکننده - پروتئین یک ژنوم را نشان می‌دهد. VP1، VP2 و VP3 پروتئین‌های ساختمانی ویروس هستند؛ ترجمه VP2 و VP3 از نقاط شروع مختلفی آغاز شده و تا انتهای کربوکسیل یکسانی ادامه می‌یابد. VP1 در یک قالب‌خواندن متفاوت ترجمه می‌شود؛ قسمت انتهای آمینوی آن با ژن‌های VP2/VP3 همپوشان است، ولی توالی اسید آمینه‌ای این قطعه همپوشان از VP2 و VP3 متفاوت است. دو پروتئین، شامل آنتی‌ژن‌های توموری T بزرگ و t کوچک، ترانسفورماسیون سلول‌های عفونت‌یافته را تسریع می‌کنند. اینها در یک پیش‌ساز mRNA مشترک کد می‌شوند و توالی‌های انتهای آمینوی یکسانی دارند، ولی قسمت انتهای کربوسیل پروتئین t توسط قطعه‌ای از mRNA کد می‌شود که با اسپلایس پیام T بزرگ حاصل شده و توالی انتهای کربوکسیل T بزرگ در RNAای کد می‌شود که به دنبال t کوچک می‌آید. مبداء همانندسازی DNA (ori) در خارج ناحیه کدکننده قرار دارد.

اتصال به حاملین tRNA مناسب، فعال شوند. این فرایند دو مرحله‌ای توسط خانواده‌ای از **آمینوآسیل-tRNA سنتتازها** کاتالیز می‌گردد که هر کدام از آنها برای یک اسید آمینه و ملکول‌های tRNA مربوطه اختصاصی هستند. واکنش معمولاً به صورت زیر نوشته می‌شود:

$$\text{H—N(H)—CH(R)—C(=O)—OH} + \text{ATP} + \text{E} \rightleftharpoons \left[\text{H—N(H)—CH(R)—C(=O)} - \text{AMP}\cdot\text{E}\right] + \text{PP}_i \qquad (1)$$

$$\left[\text{H—N(H)—CH(R)—C(=O)} - \text{AMP}\cdot\text{E}\right] + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{H—N(H)—CH(R)—C(=O)—tRNA} + \text{AMP} + \text{E} \qquad (2)$$

Sum:

$$\text{H—N(H)—CH(R)—C(=O)—OH} + \text{ATP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{H—N(H)—CH(R)—C(=O)—tRNA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

کروشه‌های موجود در اطراف کمپلکس آمینوآسیل -tRNA نشان می‌دهد که این کمپلکس یک ترکیب واسط متصل به آنزیم زودگذر است. آمینوآسیل آدنیلات که یک انیدرید اسیدی مخلوط اجزاء کربوکسیل و فسفریل است، یک ترکیب پُر - انرژی می‌باشد. اتصال استری آمینوآسیل موجود در tRNA انرژی کمتری نسبت به آمینوآسیل-آدنیلات دارد، ولی همچنان این میزان بیشتر از گروه کربوکسیل اسید آمینه آزاد است. پیروفسفاتازها با تجزیه پیروفسفات تولیدی، تعادل را قویاً به سمت تولید آمینوآسیل -tRNA تغییر می‌دهند. از نقطه نظر صحت

ارتباط بالینی ۵-۶

تغییر قالب در بیوسنتز پروتئین‌های HIV

حفظ قالب‌خواندن در هنگام ترجمه برای درستی ترجمه اهمیت اساسی دارد. با این وجود بسیاری از رتروویروس‌ها، شامل ویروس HIV ایجادکننده ایدز، از لغزش mRNA و تغییر در قالب‌خواندن برای تولید پروتئین‌های مختلف از یک پیام استفاده می‌کنند. یک mRNA که به صورت gag-pol نمایش داده می‌شود، دو پلی‌پروتئین را کد می‌کند که حدود ۲۰۰ نوکلئوتید همپوشان یکدیگر هستند و قالب خواندن متفاوتی دارند. پلی‌پروتئین gag از کدون شروع تا یک کدون خاتمه داخل - قالب در نزدیکی محل اتصال gag-pol ترجمه می‌شود؛ پلی‌پروتئین gag شکسته‌شده تا چندین پروتئین ساختمانی این ویروس تولید شوند. هر چند، در حدود ۵٪ موارد، یک تغییر قالب تک- نوکلئوتیدی در داخل قطعه همپوشان mRNA رخ داده و از کدون خاتمه رد می‌شود، زیرا دیگر در قالب خواندن وجود ندارد. پلی‌پروتئین ادغامی gag-pol تولید می‌شود؛ شکستن پروتئولیتیک پلی‌پروتئین pol تولید ترانس‌کریپتاز معکوس و سایر پروتئین‌های مورد نیاز تولیدمثل ویروس را می‌کند (ارتباطات بالینی ۲-۴ و ۳-۱۳ را ببینید).

ترجمه، اسید آمینه‌ای که تنها براساس زنجیر جانبی (گروه R) خود تمایز داده می‌شود، به یک حامل بزرگ و کمپلکس اتصال می‌یابد که به‌راحتی تمایز داده می‌شود.

ویژگی و صداقت واکنش‌های آمینوآسیلاسیون

تقریباً تمامی سلول‌ها حاوی ۲۰ آمینوآسیل -tRNA سنتتازی هستند که هر کدام از آنها برای یک اسید آمینه و در اکثر موارد خانواده کوچکی از ملکول‌های tRNA حامل اختصاصی هستند (برای موارد استثناء یک نگاه دقیق‌تر ۱-۶ را ببینید). از آنجایی که تعاملات کدون- آنتی‌کدون، نوع اسید آمینه‌ای را تعیین می‌کند که در داخل زنجیر پلی‌پپتیدی قرار داده می‌شود، ملکول tRNAای که به غلط آسیله شده است، منجر به خطا در سنتز پروتئین می‌شود. لذا انتخاب صحیح هم tRNA و هم اسید آمینه توسط سنتتاز، نقش مرکزی در صداقت ترجمه دارد. آمینوآسیل -tRNA سنتتازها یک مکانیسم مشترک دارند و بسیاری از آنها در داخل سلول به‌صورت کمپلکس‌های چندپروتئینی وجود دارند. با این وجود، گروه متنوعی از پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهند که ممکن است حاوی یک، دو یا چهار زیرواحد یکسان یا جفت‌هایی از زیرواحدهای غیرمشابه باشند. دومن‌های ساختمانی متفاوت می‌توانند در تولید آمینوآسیل-آدنیلات، شناسایی tRNA و، در صورت وجود، تعاملات زیرواحدی، نقش داشته باشند. هر آنزیم قادر به تولید تقریباً بدون اشتباه ترکیب‌های آمینوآسیل- tRNA صحیح هستند. برخی اسیدهای آمینه به‌واسطه داشتن زنجیرهای جانبی بزرگ (برای مثال، تریپتوفان)، کوچک (گلیسین)، و بار مثبت یا منفی (برای مثال، لیزین و گلوتامات)، براحتی تشخیص داده می‌شوند. تمایز بقیه بسیار مشکل‌تر است. برای مثال، تمایز والین از ترئونین یا ایزولوسین توسط والیل -tRNA سنتتاز مشکل است، زیرا تفاوت زنجیر جانبی تنها در اضافه‌شده یک گروه هیدروکسیل یا یک متیل می‌باشد.

جایگاه‌های شناسایی و فعال‌سازی هر آنزیم، ویژگی زیادی دارد، ولی گاهی احتمال تشخیص اشتباه وجود دارد. یک مرحله **غلط‌گیری** اضافی سبب افزایش تمایز توسط بسیاری (ولی نه تمامی) آمینوآسیل -tRNA سنتتازها می‌شود. این غلط‌گیری اغلب از طریق هیدرولیز ترکیب واسط آمینوآسیل‌آدنیلات همراه با آزادسازی اسید آمینه و AMP صورت می‌پذیرد. والیل -tRNA سنتتاز به شکل مؤثری ترئونیل-آدنیلات را هیدرولیز می‌کند و ایزولوسیل- آدنیلات را در حضور $tRNA^{Val}$ (ولی نه آمینوآسیله) هیدرولیز می‌کند. به طریق دیگر، tRNA حاوی آسیل غلط، شناسایی و دآسیله می‌شود. والیل-، فنیل‌آلانیل-، و ایزولوسیل -tRNA سنتتازها، ملکول‌های tRNAای را دآسیله می‌کنند که به غلط به‌ترتیب با ترئونین، تیروزین و والین شارژ شده‌اند. نتیجه خالص، میزان متوسط آسیلاسیون غلط یک در 10^4 تا 10^5 می‌باشد.

هر سنتتاز همچنین می‌بایست به‌طور صحیحی یک یا چند نوع tRNAای را مورد شناسایی قرار دهد که می‌تواند یک اسید آمینه را حمل کنند، در حالی که انواع غلط tRNA را

رد می‌کند. ممکن است این انتخاب ساده‌تر از انتخاب یک اسید آمینه باشد. با این وجود به شباهت‌های کونفورماسیونی و عناصر توالی مشترک موجود در تمامی ملکول‌های tRNA توجه داشته باشید (ص.۲۹۶). سنتتازهای مختلف عناصر متفاوتی را در ساختمان tRNA شناسایی می‌کنند. معمولاً عناصر ساختمانی متعددی در شناسایی نقش دارند، ولی بسیاری از این عناصر شاخص‌های قطعی نیستند. یکی از عناصر مورد انتظار برای شناسایی tRNA، آنتی‌کدون می‌باشد. در مورد $tRNA^{met}$، تغییر در آنتی‌کدون سبب تغییر در شناسایی توسط سنتتاز می‌شود. در موارد دیگر، این موضوع تا حدودی صحیح است و گاهی آنتی‌کدون شاخصی بـرای شناسایی نیست. این موضوع توسط **جهش‌های سرکوبگری**[1] نشان داده می‌شود که بیان کلاس‌هایی از جهش‌های بی‌معنی را سرکوب می‌کنند. یک جهش نقطه‌ای در یک کدون گلوتامین (CAG) سبب تولید کدون خاتمه‌های (UAG) می‌شود که سبب خاتمه نارس پروتئین کدشونده می‌گردد. جهش سرکوبگر دوم در آنتی‌کدون یک $tRNA^{tyr}$ که در آن آنتی‌کدون طبیعی GUA به CUA تغییر یافته است، امکان «خواندن و عبور» از این کدون خاتمه را فراهم می‌سازد. جهش ابتدایی سرکوب شده و یک پروتئین تقریباً طبیعی ساخته می‌شود که در آن گلوتامین تحت تأثیر قرار گرفته توسط تیروزین جایگزین شده است. آمینوآسیلاسیون این $tRNA^{tyr}$ جهش‌یافته با تیروزین نشان می‌دهد که در این حالت، آنتی-کدون ویژگی سنتتاز را تعیین نمی‌کند.

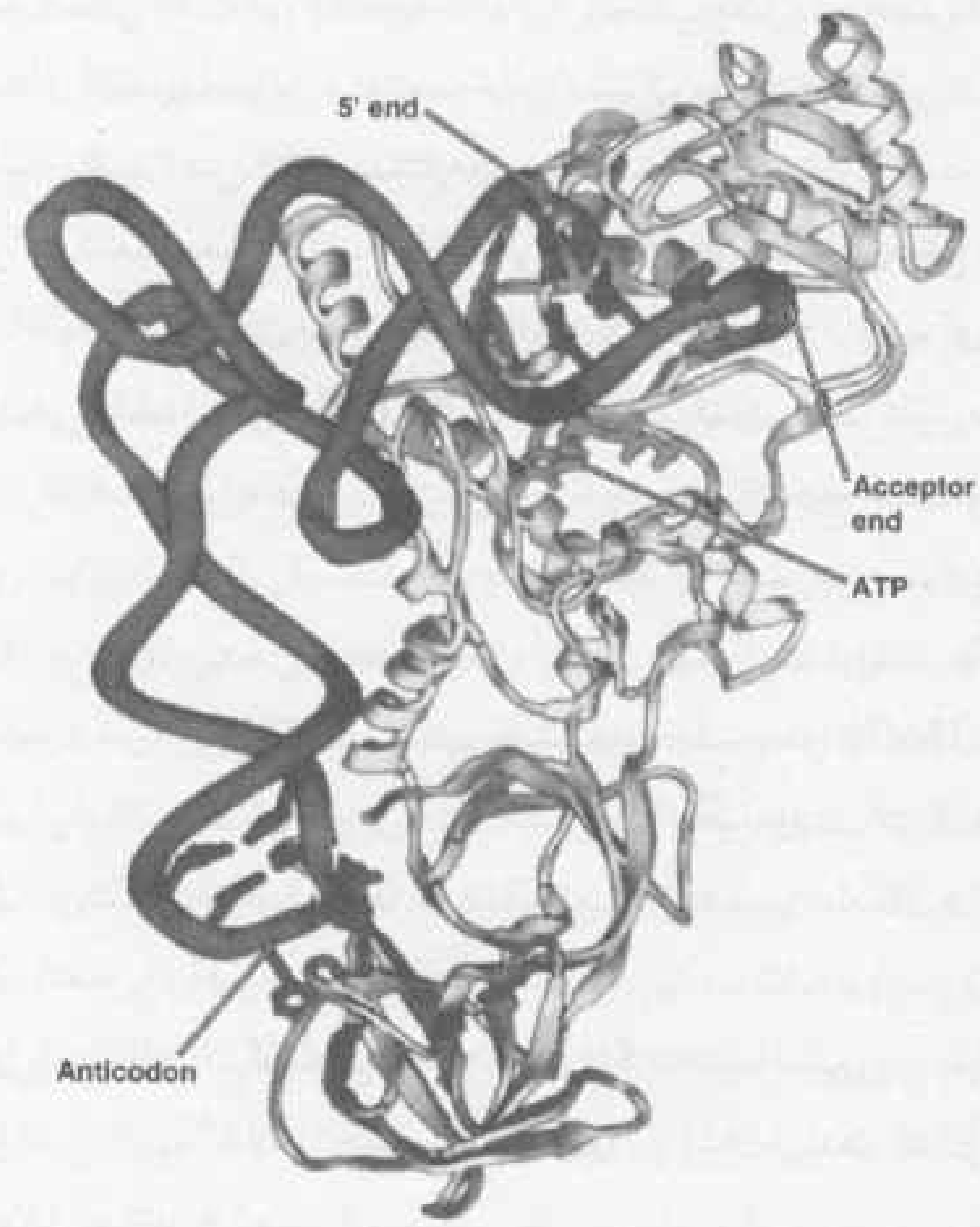
سایر خصوصیات شناسایی tRNA ممکن است شامل عناصر ساقه گیرنده و قسمت-هایی از قوس متغیر یا قوس - ساقه D باشند. در $tRNA^{ala}$ باکتری *E.coli*، مشخصه اولیه یک جفت باز G3-U70 در ساقه گیرنده می‌باشد؛ حتی اگر تغییر دیگری در $tRNA^{ala}$ رخ ندهد، هر نوع تغییری در این موقعیت سبب ازبین‌رفتن توانایی گیرنده‌ای آن توسط آلانیل - $tRNA^{ala}$ سنتتاز می‌شود. ساختمان اشعه-Xکمپلکس گلوتامینیل سنتتاز-tRNA که در شکل ۳-۶ مشاهده می‌گردد، اتصال به سطح مقعر tRNA را نشان می‌دهد که قابل قیاس با مشاهده بیوشیمیایی است.

ریبوزوم‌ها ماشین‌های بیوسنتز پروتئین هستند

ریبوزوم‌ها ذرات **ریبونوکلئوپروتئینی** پیچیده‌ای هستند که محل و اساس کاتالیتیکی سنتز پروتئین را فراهم می‌کند. این ذرات شامل دو زیرواحد غیرمشابه هستند که هر کدام حاوی RNA و پروتئین‌های متعددی می‌باشد. با یک استثناء، هر کدام از این پروتئین‌ها، همانند هر کدام از ملکول‌های tRNA، به تعداد یک نسخه در هر سلول وجود دارد. ترکیب انواع اصلی ریبوزوم‌ها در جدول ۷-۶ نشان داده شده است.

معماری و عملکرد ریبوزوم طی دوره تکامل حفظ شده است و شباهت‌های موجود در بین ریبوزوم‌ها و زیرواحدهای مربوط به منابع مختلف، مهمتر از تفاوت‌های آنها می‌باشد.

1. Suppressor mutations



شکل ۳-۶ **تعامل یک tRNA با آمینوآسیل - tRNA سنتتاز.** اسکلت قند - فسفات گلوتامینیل -tRNA از *E.coli* در چند رنگ نشان داده شده است. این سنتتاز با ساقه گیرنده تا حدودی بازشده و قوس آنتی‌کدون tRNA تعامل می‌کند. ATP که با رنگ قرمز نشان داده شده است، در فاصله چند آنگسترومی انتهای ′۳ ملکول tRNA قرار دارد. مدل‌های فضا - پرکن این کمپلکس، هر دو ملکول را به شکل اجسام جامد همراه با چندین جایگاه برای تماس مستقیم نشان می‌دهند.

جدول ۷-۶ • طبقه‌بندی و ترکیب ریبوزوم‌ها

منبع ریبوزوم	اندازه منومر	زیرواحدها: کوچک	زیرواحدها: بزرگ
اوکاریوت‌ها			
سیتوزول	۸۰S	۴۰S: ۳۴ پروتئین، ۱۸S RNA	۶۰S: ۵۰ پروتئین، ۵S ،۵٫۸S ،۲۸S RNAs
میتوکندری‌ها حیوانات	۵۵S -۶۰S	۳۰S -۳۵S: ۱۲S RNA	۴۰-۴۵S: ۱۶S RNA
		۱۰۰-۷۰ پروتئین	
گیاهان عالی	۷۷S -۸۰S	۴۰S: ۱۹S RNA	۶۰S: ۵S ،۲۵ S RNAs
		۷۵-۷۰ پروتئین	
کلروپلاست‌ها	۷۰S	۳۰S: ۲۴-۲۰ پروتئین، ۱۶S RNA	۵۰S: ۳۸-۳۴ پروتئین، ۴٫۵S ،۵S ،۲۳S RNAs
پروکاریوت‌ها *Escherichia coli*	۷۰S	۳۰S: ۲۱ پروتئین، ۱۶S RNA	۵۰S: ۳۴ پروتئین، ۵S،۲۳S ،RNAs

یک نگاه دقیق‌تر ۲-۶

ساختمان و عملکرد ریبوزوم

برای تشریح معماری و عناصر عملکردی پیچیده ریبوزوم‌ها، به‌خصوص در زمانی که دسترسی به ساختمان‌های اشعه-X وجود ندارد، نیاز به استفاده از تکنیک‌های زیادی است. تکنیک‌های اصلی عبارتند از:

۱. تفرق نوترونی زیرواحدهای بازسازی‌شده که در آنها دو پروتئین دناتوره شده‌اند: به این طریق امکان جداسازی آن دو پروتئین به زیرواحد فراهم می‌گردد.

۲. میکروسکوپی الکترونی کمپلکس‌هایی از ذرات با آنتی‌بادی‌هایی ضد یک جزء پروتئینی، عنصر RNA، یا پروب وظیفه‌دار: شکل ۷-شکل آنتی‌بادی به عنوان یک اشاره‌کننده به موقعیت این جزء عمل می‌کند.

۳. ایجاد اتصال عرضی: تعیین اجزاء دارای اتصالات عرضی امکان تعیین هویت پروتئین‌های مجاور، پروتئین‌هایی با قطعات RNA، و عناصر RNAای که ممکن است در توالی دور ولی در ساختمان تاشده نزدیک باشند را فراهم می‌سازد.

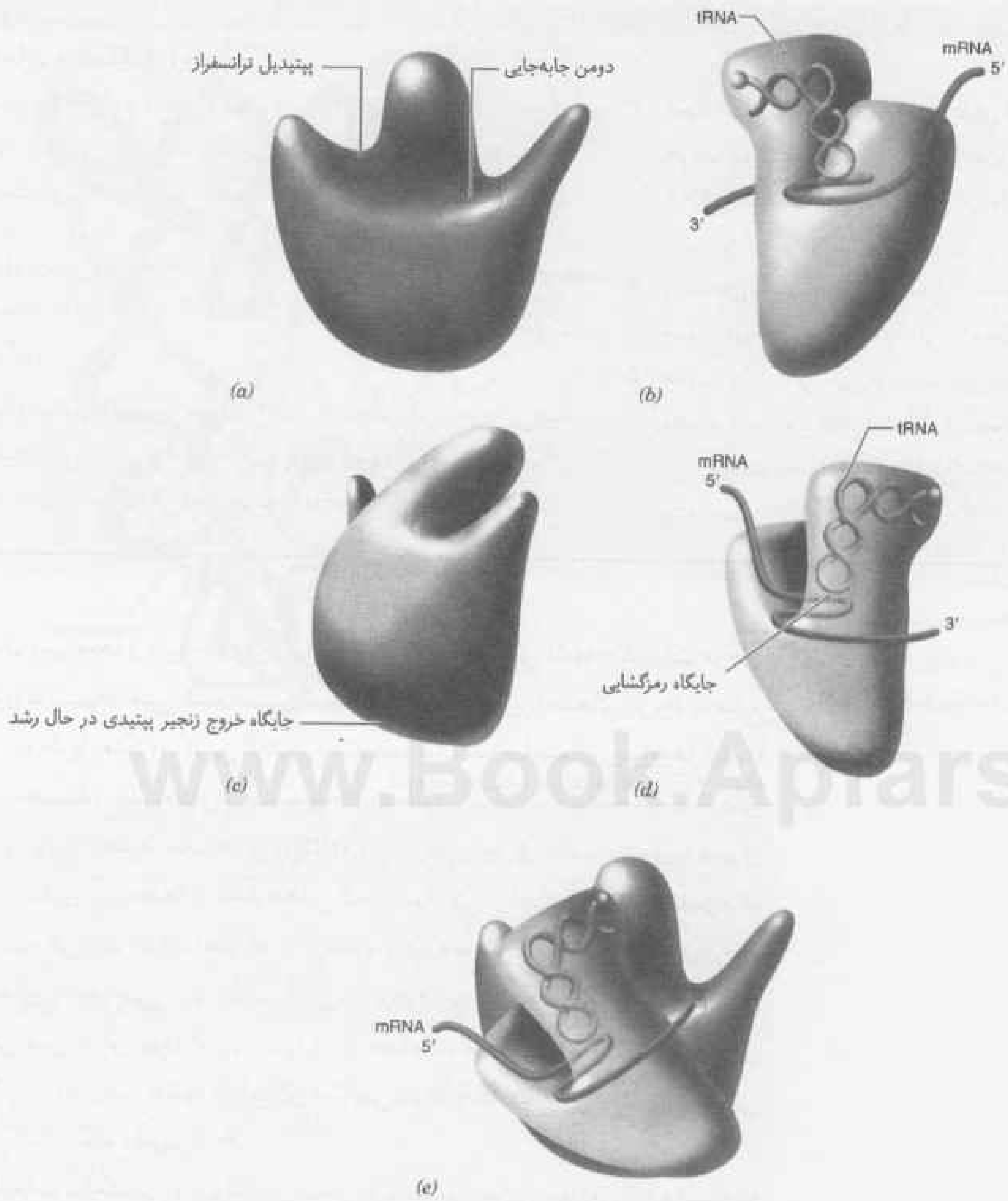
۴. پروب‌های شیمیایی و آنزیمی: اجزاء در معرض قرارگرفته می‌توانند شناسایی شوند، در حالی که اجزاء داخلی یا مخفی‌شده مقاوم هستند.

۵. مقایسه توالی: توالی‌هایی می‌توانند تعیین‌هویت شوند که در تکامل حفظ شده‌اند و به‌همین دلیل احتمالاً برای ساختمان و عملکرد مهم هستند. این رهیافت به‌خصوص در تعیین ساختمان‌های ۲° در rRNA مهم بوده است.

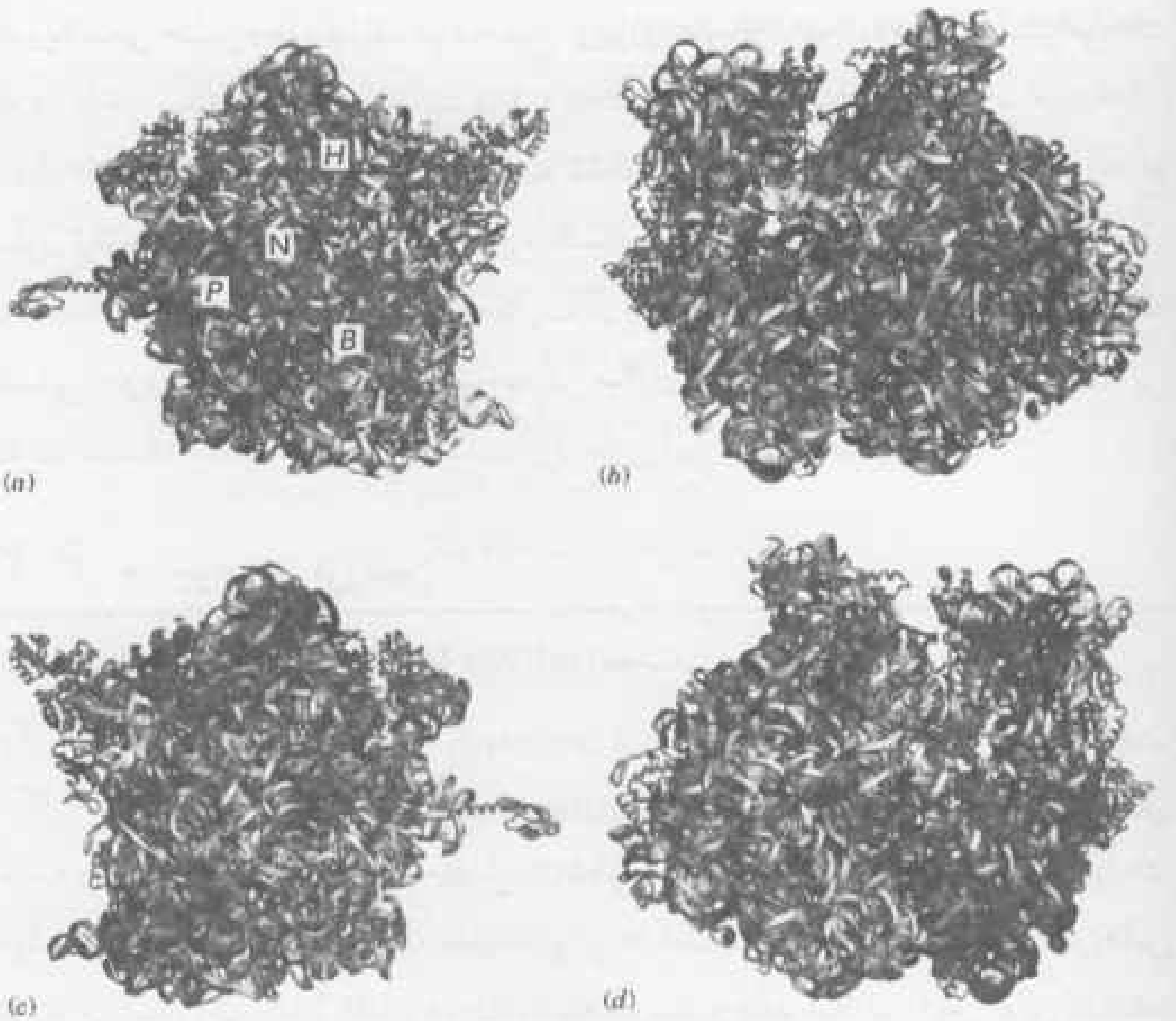
ساختمان ریبوزوم‌ها و زیرواحدهای آنها به طریق کریستالوگرافی اشعه-X ذرات موجود در میکروارگانیسم‌ها تعیین شده است. همچنین ریبوزوم‌ها و زیرواحدهای مربوط به منابع متعددی به طریق میکروسکوپی الکترونی مشاهده شده‌اند؛ ساختمان ریبوزوم‌ها شدیداً حفظ‌شده هستند. ریبوزوم‌های پروکاریوتی قادر به خود-همایش[1] هستند؛ ساختمان‌های بومی را می‌توان از مخلوط ملکول‌های tRNA و پروتئین‌های مجزای خالص‌شده دوباره‌سازی کرد. دوباره‌سازی زیرواحدها از مخلوط‌هایی که در آنها یکی از اجزاء حذف و یا تغییر داده شده است، می‌تواند نشان دهد که آیا آن جزء برای همایش زیرواحدی یا برای برخی فعالیت‌های اختصاصی مهم است یا خیر. با وجود این که دوباره‌سازی زیرواحدهای اوکاریوتی هنوز موفق نبوده است، بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که ریبوزوم‌های پروکاریوتی و اوکاریوتی نه تنها مورفولوژی مشابهی دارند، بلکه همچنین به طریق یکسانی عمل می‌کنند (نگاه دقیق‌تر ۲-۶).

مطالعات ساختمانی و عملکردی منجر به تولید مدل‌های ریبوزومی شده است که خصوصیات آنها در شکل ۴-۶ شرح داده شده‌اند؛ شکل ۵-۶ ساختمان‌های اشعه-X مربوط به ریبوزوم‌ها و کمپلکس‌های آنها با mRNA و tRNA را نشان می‌دهد. ریبوزوم‌ها به دو طریق سازماندهی می‌شوند. اغلب یک ملکول mRNA واحد به‌طور همزمان توسط چندین ریبوزوم ترجمه می‌شود. شکل ۶-۶ میکروگراف‌های الکترونی را از **پلی‌زوم‌ها** نشان می‌دهد که در آنها ریبوزوم‌ها از طریق mRNA به یکدیگر متصل شده‌اند. در سلول‌های اوکاریوتی، ریبوزوم‌ها به صورت آزاد در داخل سیتوزول و به شکل متصل به غشاء **شبکه**

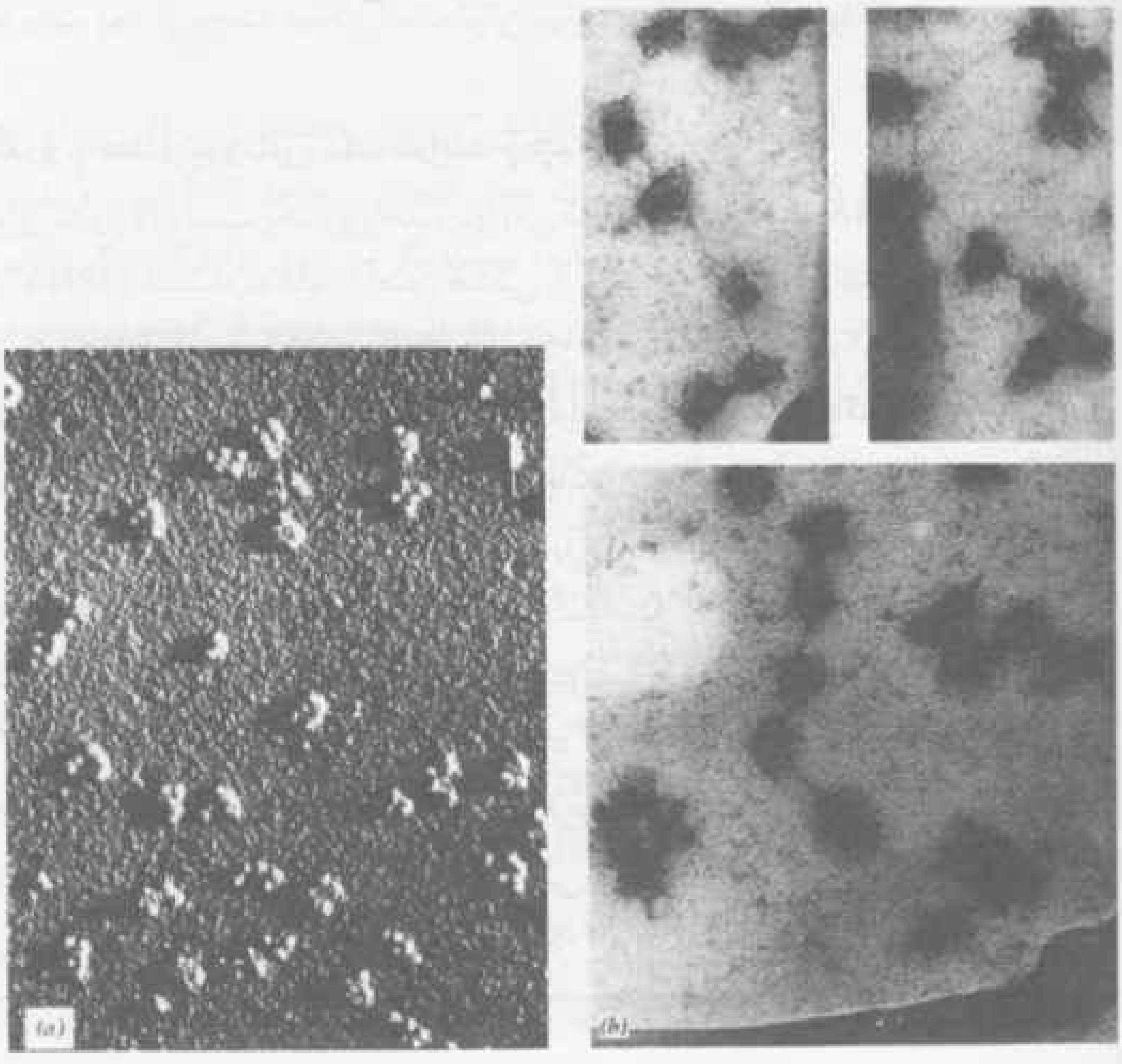
1. Self-assemble



شکل ۴-۶ مدلی برای ساختمان و جایگاه‌های وظیفه‌دار ریبوزوم. ردیف بالا: سمتی از هر کدام از زیرواحدها که در ریبوزوم وظیفه‌دار تعامل می‌کنند. در (a) جایگاه‌هایی از زیرواحد بزرگ مرتبط با تولید پیوند پپتیدی (پپتیدیل ترانسفراز) و اتصال فاکتور طویل‌سازی (دومن جابه‌جایی)، بر روی لبه‌های مخالف دیده می‌شوند. ساقه به سمت راست برآمدگی دارد. (b) سکوی زیرواحد کوچک به سمت خواننده می‌باشد. mRNA و ملکول‌های tRNA در جایگاه رمزگشایی، در شکافی بین این سکو و جسم زیرواحد، با یکدیگر تعامل می‌کنند. (c) زیرواحد بزرگ ۹۰° چرخیده، ساقه به داخل صفحه امتداد یافته و جایگاه خروج پپتید در حال سنتز در نزدیکی پایه زیرواحد قرار دارد. در ریبوزوم‌هایی که به شبکه آندوپلاسمی خشن اتصال دارند، این جایگاه با غشاء تماس برقرار می‌کند. جایگاه تولید پیوند پپتیدی دور از جایگاه خروج است؛ پپتید درحال رشد از میان شکافی یاکانالی در ریبوزوم عبور می‌کند تا به جایگاه خروج برسد. در (d) زیرواحد کوچک ۹۰° چرخیده است؛ سکو به داخل صفحه امتداد دارد. (e) زیرواحدها در کنار یکدیگر قرار داده شده‌اند تا موقعیت آنها در ریبوزوم نشان داده شود. آمینوآسیل -tRNA متصل به زیرواحد کوچک طوری قرار گرفته است که انتهای گیرنده در نزدیکی پپتیدیل ترانسفراز است، در حالی که دومن جابه‌جایی نزدیک جایگاه رمزگشایی می‌باشد.



شکل ۵-۶ ساختمان کریستالوگرافیک یک ریبوزوم 70S. ساختمان ریبوزوم باکتری *Thermus thermophilus* با میزان تفکیک 5.5Å نشان داده شده است. تصاویر متوالی ۹۰° حول محور عمودی چرخیده‌اند. (a) زیرواحد کوچک در بالای زیرواحد بزرگ، همانند مدل شکل ۴e-۶، قرار دارد. بخش‌های مربوط به زیرواحد کوچک شامل سکو (P)، سر (H)، جسم (B)، و یک گردن متصل‌کننده (N) می‌باشند. 16S RNA رنگ کبود و پروتئین‌های زیرواحد کوچک رنگ آبی دارند. (b) زیرواحد بزرگ در سمت راست است: RNA 23S رنگ آبی روشن و پروتئین‌های زیرواحد بزرگ رنگ ماژنتا دارند. یک ملکول tRNA (طلایی) بر روی زیرواحدها پل می‌زند. (c) زیرواحد بزرگ در بالا قرار دارد و ساقه آن به چپ امتداد یافته است. (d) زیرواحد بزرگ در سمت چپ و عناصر tRNA در فصل مشترک زیرواحدی قابل مشاهده هستند.



شکل ۶-۶ میکروگراف‌های الکترونی پلی‌زوم‌ها. (a) پلی‌ریبوزوم‌های رتیکولوسیتی با سایه پلاتینی به صورت دستجاتی از سه تا شش ریبوزوم، به تعدادی که سازگار با اندازه mRNA یک زنجیر گلوبینی باشد، مشاهده می‌شوند. (b) رنگ‌آمیزی با اورانیل استات و مشاهده با بزرگنمایی بیشتر، پلی‌زوم‌ها را نشان می‌دهد؛ قسمت‌هایی از mRNA قابل مشاهده هستند.

آندوپلاسمی خشن وجود دارند. در مجموع، **ریبوزوم‌های آزاد** پروتئین‌هایی را سنتز می‌کنند که در داخل سیتوزول باقی می‌مانند و یا به داخل هسته، میتوکندری یا چند اندامک دیگر انتقال داده می‌شوند. **ریبوزوم‌های متصل به غشاء** پروتئین‌هایی را سنتز می‌کنند که به خارج سلول ترشح شده و یا در غشاء پلاسمایی، شبکه آندوپلاسمی، دستگاه گلژی یا لیزوزوم‌ها قرار داده می‌شوند و در این محل‌ها فعالیت می‌کنند. در هُموژنات‌های سلولی، قطعات غشایی حاوی ریبوزوم‌های اتصال‌یافته، بخش **میکروزومی** را تشکیل می‌دهند؛ دترژنت‌هایی که به غشاءها آسیب می‌رسانند، سبب آزادسازی این ریبوزوم‌ها می‌شوند.

۳-۶ • بیوسنتز پروتئین

ترجمه جهت‌دار و هم‌خط با mRNA است

توالی RNA پیک در جهت ′۵ ← ′۳ رونویسی و نوشته می‌شود، و طی ترجمه نیز به‌همین شکل خوانده می‌شود. توالی‌های اسید آمینه‌ای نیز از انتهای آمینو به انتهای کربوکسیل نوشته و سنتز می‌شوند. ریبوزوم متصل به ملکول mRNA باقی می‌ماند: پیام در طول آن حرکت کرده تا به یک کدون برسد. مقایسه توالی ملکول‌های mRNA با توالی پروتئین‌هایی که کد می‌کنند، یک ارتباط کامل، هم‌خط، غیرهمپوشان و فاقد شکاف را بین توالی کدکننده mRNA و زنجیر پلی‌پپتیدی سنتزشده را نشان می‌دهد. در حقیقت، استنتاج توالی یک پروتئین تنها براساس توالی نوکلئوتیدی mRNA یا DNA ژن آن معمول است، هر چند به دلیل تغییرات بعد از ترجمه ممکن است توالی نهایی پروتئین متفاوت باشد.

شروع سنتز پروتئین یک فرایند پیچیده است

برای شروع لازم است یک زیرواحد ریبوزومی کوچک (۴۰S)، یک mRNA، و کمپلکسی از tRNA و اسید آمینه انتهای آمینو، همگی با موقعیت مناسب، در کنار یکدیگر قرار داده شوند. به‌دنبال این همایش، زیرواحد بزرگ (۶۰S) اضافه شده تا یک کمپلکس شروع کامل بر روی یک ریبوزوم ۸۰S شکل بگیرد. این فرایند نیاز به چندین **فاکتور شروع**[1] پروتئینی دارد که در جدول ۸-۶ فهرست شده‌اند؛ این فاکتور تنها در مرحله شروع و آن هم به‌صورت موقتی عمل می‌کنند. شکل ۷-۶ فرایند شروع را نشان می‌دهد. ابتدا، **فاکتور شروع اوکاریوتی ۲ (eIF2)** به GTP و tRNA شروع‌کننده، یا $Met-tRNA_i^{met}$، اتصال یافته و تولید یک کمپلکس سه‌تایی می‌کند. هیچ آمینوآسیل -tRNA دیگری نمی‌تواند جایگزین $Met-tRNA_i^{met}$ اختصاصی- شروع شود. (پروکاریوت‌ها از یک tRNA شروع‌کننده اختصاصی استفاده می‌کنند که متیونین آن با فرمیلاسیون گروه آمینوی آن تغییر داده می‌شود. تنها $fMet-tRNA_i^{met}$ توسط IF2 شناسایی می‌گردد.)

مرحله دوم نیاز به زیرواحد ریبوزومی ۴۰S دارد که به یک پروتئین بسیار پیچیده،

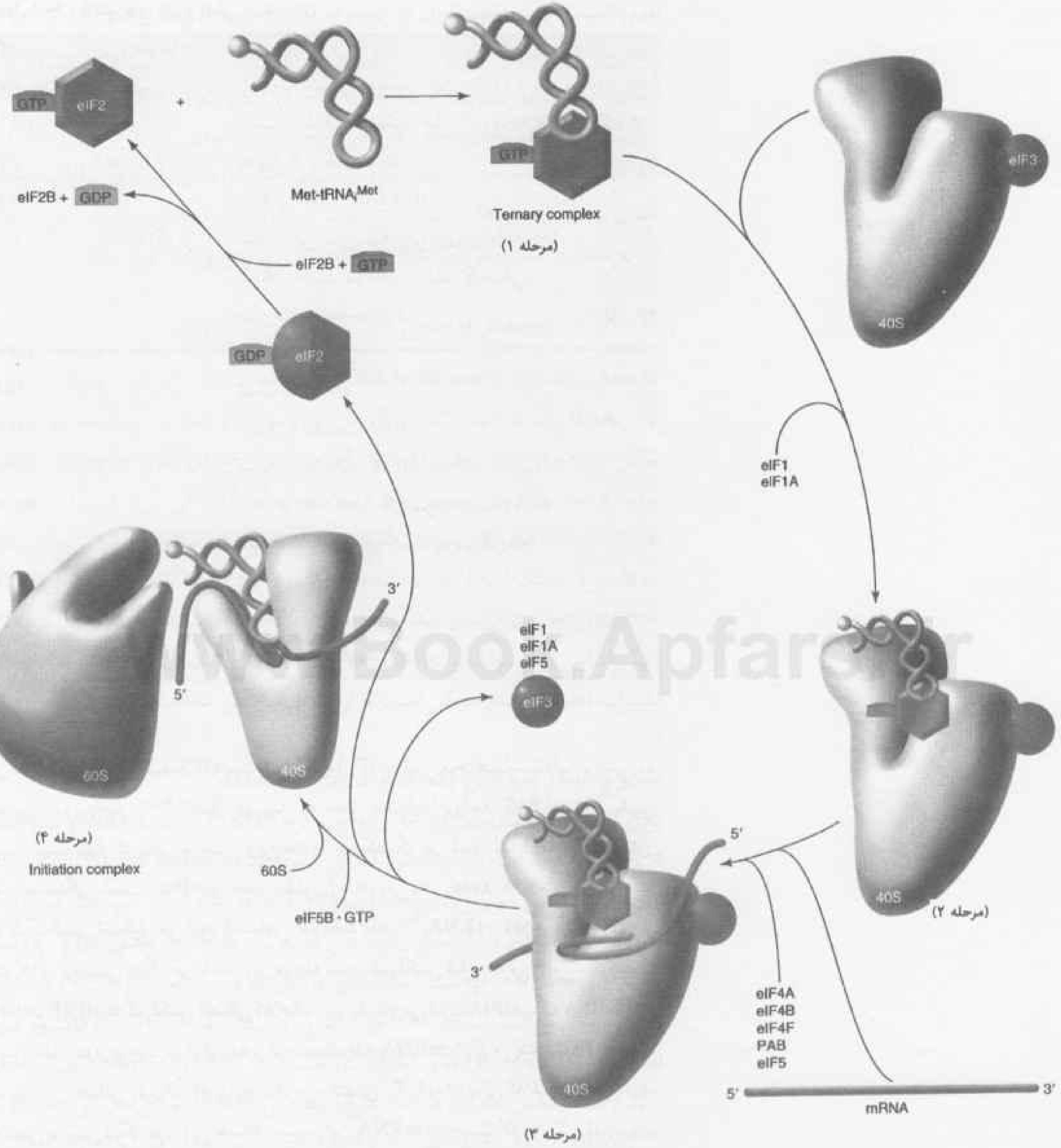
1. Initiation factor

جدول ۸-۶ • فاکتورهای شروع اصلی پستانداران

فاکتور	زیرواحدها	فعالیت‌ها
eIF1	۱	کمک به تشکیل کمپلکس قبل- شروع
eIF1A	۱	کمک به تشکیل کمپلکس قبل- شروع، اتصال به جایگاه A
eIF2	$۳(\alpha, \beta, \gamma)$	تحویل کمپلکس سه‌تایی
eIF2B		چرخش مجدد eIF2-GDP
eIF3	۱۳(a-m)	سازماندهی سایر عوامل بر روی زیرواحد ۴۰S، اتصال تنظیم‌کننده فاکتور ضد- پیوستگی، نقش‌های ناشناخته دیگر
eIF4A	۱	RNA هلیکاز
eIF4B	۱	کمک به eIF4A
eIF4E	۱	اتصال به کلاهک mRNA
eIF4F	۳	کمپلکس eIF4A، eIF4E، eIF4G
eIF4G	۱	فراخوانی mRNA،اسکن نمودن، اتصال eIF3
eIF5		GTPase برای eIF2، کمک به پیوستن ۶۰S
eIF5B		تولید ریبوزوم ۸۰S
eIF6		اتصال به ۶۰S (فاکتور ضد- پیوستن)
PAB		اتصال به پلی A در mRNA

یعنی **eIF3**، متصل می‌باشد. eIF3 پستانداران شامل ۱۳ پروتئین مختلف است؛ این پروتئین به سطحی از زیرواحد ۴۰S اتصال می‌یابد که محل اتصال زیرواحد ۶۰S است و بدین ترتیب سبب مهار فیزیکی پیوستن زیرواحدها به یکدیگر می‌شود. لذا eIF3 یک **فاکتور ضد- همبستگی**[1] است؛ **eIF6** نیز همین نقش را دارد، ولی به زیرواحد ۶۰S متصل می‌گردد. حالا کمپلکسی تشکیل می‌شود که شامل eIF2-GTP، $met-tRNA_i^{met}$، eIF3-40S و فاکتورهای پروتئینی دیگر می‌باشد. در مرحله سوم، **کمپلکس قبل- شروع**[2] تولید می‌شود؛ mRNA، eIF4F که **کمپلکس اتصالی کلاهک**[3] نیز نامیده می‌شود، **eIF4A**، یک **RNA هلیکاز** که ساختمان دوم موجود در توالی رهبر ترجمه‌نشونده mRNA را باز می‌کند، **PAB** به‌عنوان یک پروتئین اتصالی پلی A[4] که با ایجاد قوس، انتهای ′۳ را به نزدیکی کلاهک ′۵ می‌آورد، و چندین پروتئین دیگر مورد نیاز هستند. سپس این mRNA در جهت ′۵ ← ′۳ و تا رسیدن به اولین سه‌حرفی AUG اسکن می‌شود. GTP کمپلکس سه‌تایی به کمک eIF-5 هیدرولیز شده و eIF2-GDP به همراه سایر فاکتورها آزاد می‌شوند. eIF2-GDP با فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانینی eIF2B و GTP در جهت تولید مجدد eIF2-GTP برای دور بعدی شروع،

1. Anti-association factor 2. Pre-initiation complex 3. Cap-binding complex 4. polyA-binding protein



شکل ۷-۶ شروع ترجمه در اوکاریوت‌ها. جزئیات در متن آورده شده است. یک کمپلکس سه‌تایی که شامل tRNA شروع‌کننده (مرحله ۱) است با یک زیرواحد ریبوزومی کوچک ترکیب می‌شود (مرحله ۲). تعامل با mRNA همراه با تولید یک کمپلکس قبل-شروع می‌باشد (مرحله ۳). با اتصال زیرواحد بزرگ، تشکیل کمپلکس شروع تکمیل می‌شود (مرحله ۴). اشکال متفاوت eIF2 در حالت کمپلکس با GTP و GDP نشان می‌دهد که با هیدرولیز تری‌فسفات، تغییرات کونفورماسیونی حاصل می‌شود. بعد از شروع طویل‌سازی، زیرواحدهای کوچک دیگر به همان mRNA اتصال یافته تا پلی‌زوم‌ها به‌وجود آیند.

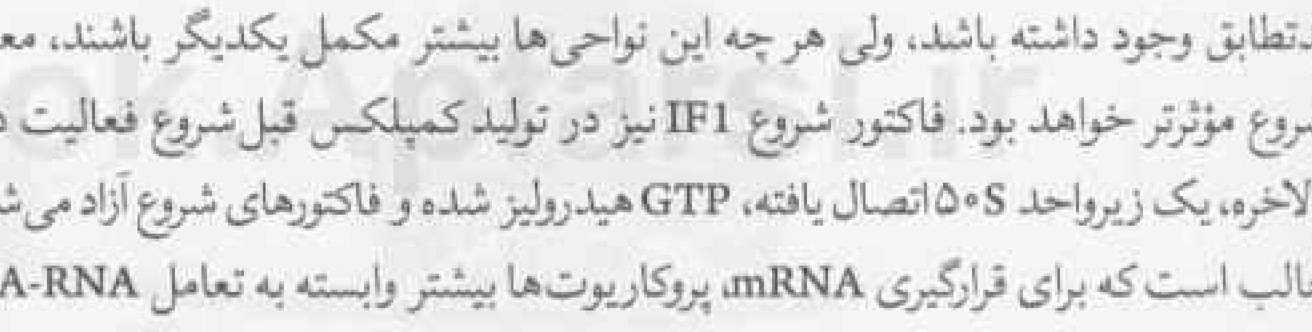
تعامل می‌کند. مرحله نهایی نیاز به اتصال زیرواحد ۶۰S به کمپلکس قبل-شروع و فاکتور دیگری به‌نام **eIF5B-GTP** دارد. GTP هیدرولیز می‌شود و eIF5B به‌همراه فاکتورهای دیگر آزاد می‌شوند. کمپلکس شروع کامل یک ریبوزوم ۸۰S است که در آن mRNA و tRNA شروع‌کننده موقعیت صحیحی را برای شروع ترجمه دارند.

گاهی اوقات اولین AUG مورد استفاده قرار نمی‌گیرد و AUG بعدی به‌واسطه ساختمان دوم خود در داخل mRNA به‌عنوان محل شروع انتخاب می‌شود. این **جایگاه‌های ورود ریبوزومی داخلی**[1] (IRES) برای اولین بار در ملکول‌های mRNA ویروسی یافت شدند، ولی در پروتئین‌های کدکننده‌ای نیز متداول هستند که سلول‌ها را در برابر استرس محافظت می‌کنند؛ طی استرس ترجمه بیشتر ملکول‌های mRNA سرکوب می‌شود.

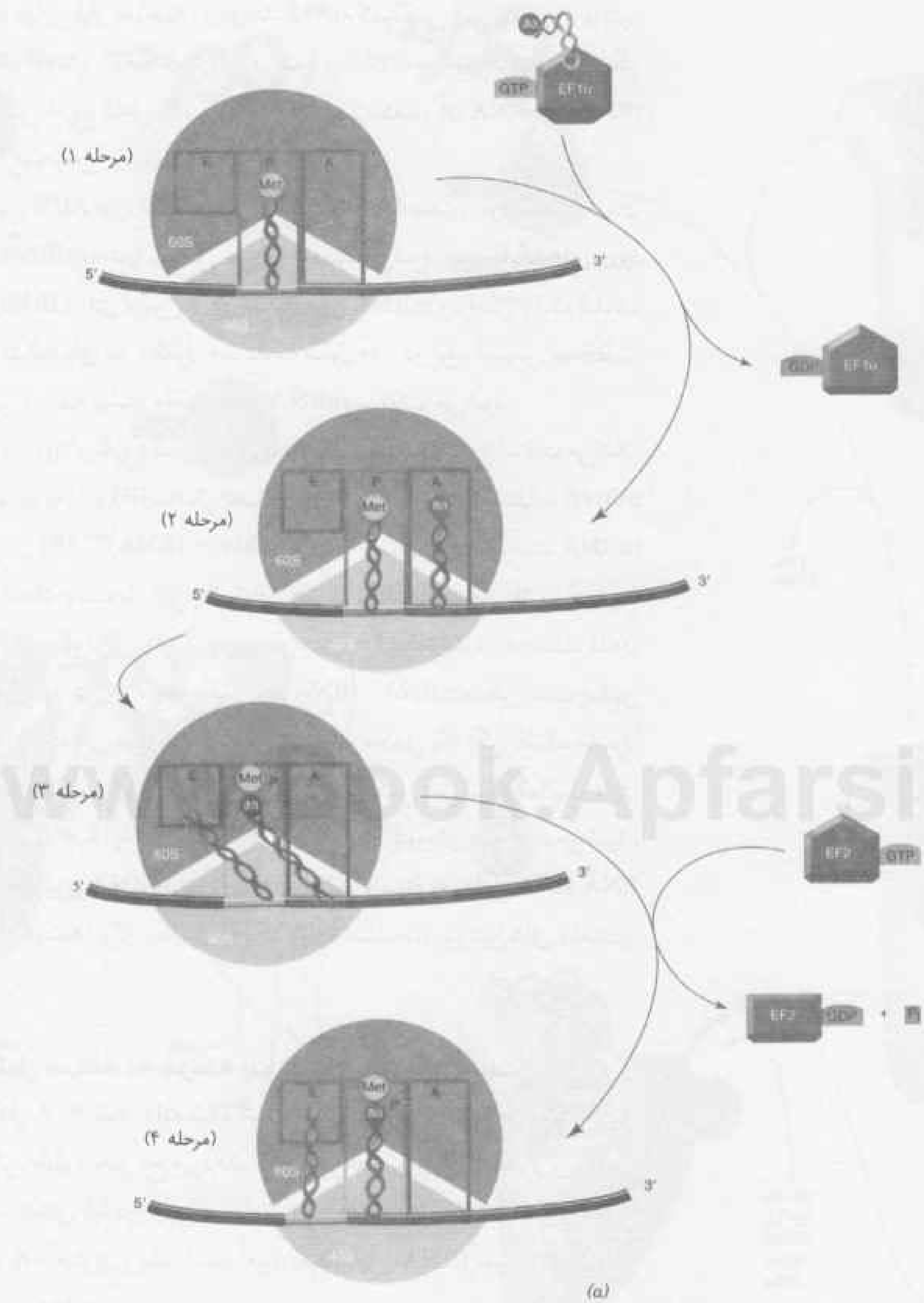
پروکاریوت‌ها از فاکتورهای شروع کمتری برای ایجاد یک کمپلکس شروع استفاده می‌کنند. زیرواحدهای ۳۰S آنها که به یک IF3 ساده‌تر اتصال یافته است، می‌تواند در ابتدا به mRNA یا کمپلکس سه‌تایی از IF2، $fMet-tRNA_i^{met}$، و GTP اتصال یابد. موقعیت mRNA تا حدودی از طریق ایجاد جفت باز بین یک توالی هشت نوکلئوتیدی غنی از پیریمیدین موجود در ۱۶S rRNA و یک توالی غنی از پورین در حدود ۱۰ نوکلئوتید در فرادست کدون AUG شروع، تعیین می‌شود. در این ناحیه مکمل بین rRNA و mRNA ممکن است چندین بدتطابق وجود داشته باشد، ولی هر چه این نواحی‌ها بیشتر مکمل یکدیگر باشند، معمولاً شروع مؤثرتر خواهد بود. فاکتور شروع IF1 نیز در تولید کمپلکس قبل‌شروع فعالیت دارد. بالاخره، یک زیرواحد ۵۰S اتصال یافته، GTP هیدرولیز شده و فاکتورهای شروع آزاد می‌شوند. جالب است که برای قرارگیری mRNA، پروکاریوت‌ها بیشتر وابسته به تعامل RNA-RNA هستند، در حالی اوکاریوت‌ها برای رسیدن به یک نتیجه مشابه، از پروتئین‌های متعددی استفاده می‌کنند.

طویل‌سازی تشکیل مرحله به مرحله پیوندهای پپتیدی است

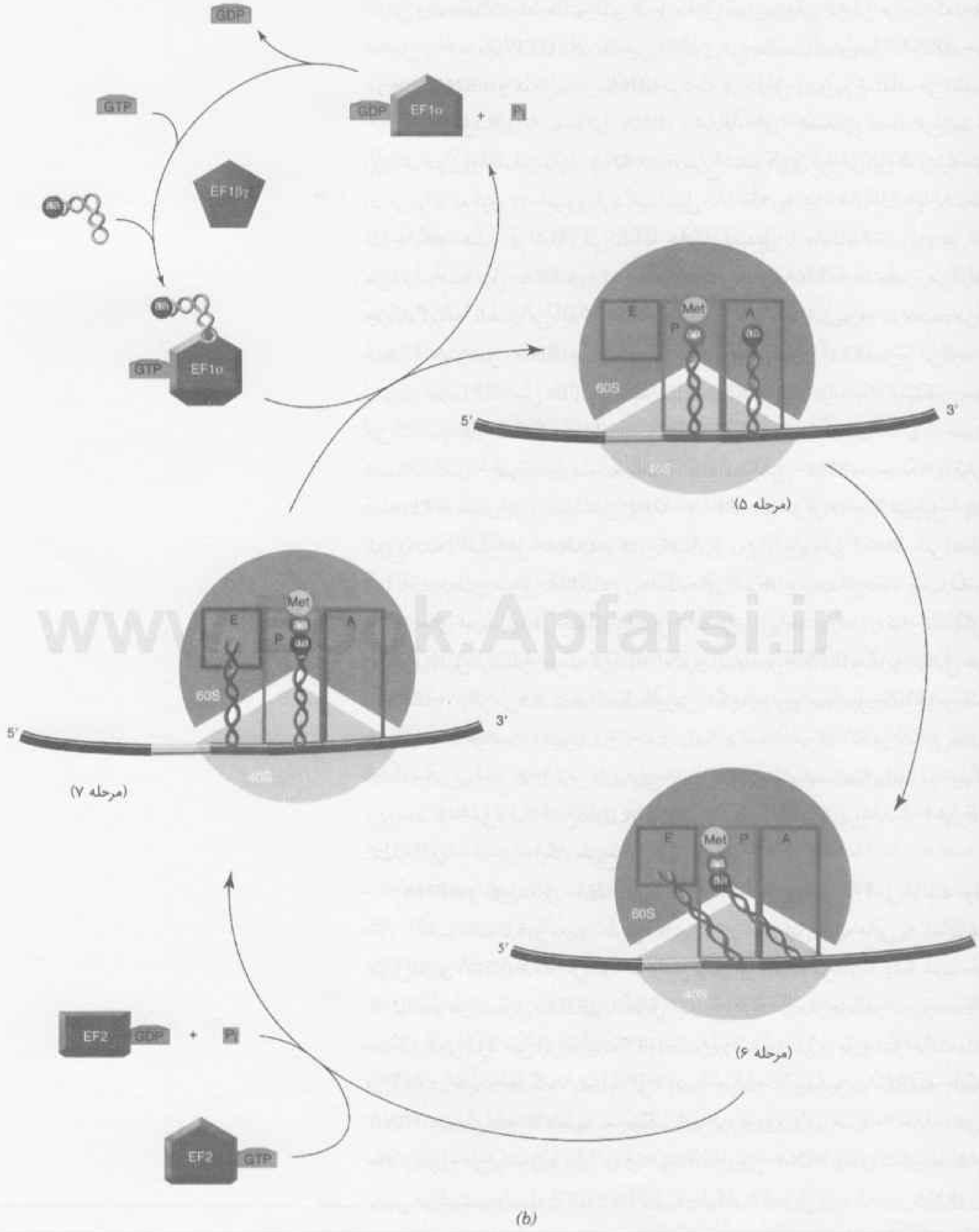
همان‌طور که در شکل ۸-۶ نشان داده شده است، طویل‌سازی پروتئین طی یک فرایند مرحله‌به‌مرحله افزایش طول زنجیر رخ می‌دهد. در هر مرحله، **پپتیدیل ترانسفراز** ریبوزومی زنجیر در حال رشد پپتیدی (یا در اولین مرحله، ریشه متیونین شروع‌کننده) را از حامل tRNA خود به گروه α-آمینوی ریشه اسید آمینه آمینوآسیل-tRNA تعیین‌شده توسط کدون بعدی، انتقال می‌دهد:



1. Internal ribosome entry sites



شکل ۸-۶ مراحل طویل‌سازی در سنتز پروتئین. (a) اولین دور طویل‌سازی نشان داده شده است. مرحله ۱: یک کمپلکس شروع با متیونیل $tRNA_i^{met}$ در جایگاه P مجموعه ۸۰S. مرحله ۲: EF1α یک آمینوآسیل tRNA را در جایگاه A قرار می‌دهد. هیدرولیز GTP منجر به یک تغییر کونفورماسیونی در EF1α می‌شود. مرحله ۳: یک پیوند پپتیدی تولید می‌شود؛ پپتیدیل tRNA جدید یک جایگاه هیبرید P/A را بر روی ریبوزوم اشغال می‌کند و ساقه گیرنده $tRNA_i^{met}$ در جایگاه E زیرواحد بزرگ قرار می‌گیرد. مرحله ۴: کمپلکس mRNA- پپتیدیل tRNA به جایگاه P انتقال می‌یابد. در حالی‌که tRNA شروع‌کننده دآسیله به جایگاه E می‌رود. (b) دورهای بعدی طویل‌سازی. مرحله ۵: اتصال آمینوآسیل-tRNA به جایگاه A سبب آزادسازی tRNA دآسیله از جایگاه E می‌شود. مرحله ۶: تولید پیوند پپتیدی سبب می‌شود تا tRNA پپتیدیل جدید یک جایگاه A/P را اشغال کند. مرحله ۷: با جابه‌جایی سبب حرکت mRNA شده و پپتیدیل tRNA جدید در جایگاه P باقی می‌ماند. اسیدهای آمینه دیگر با تکرار متوالی این چرخه اضافه می‌گردند. جزئیات چرخش مجدد EF1α (بالا چپ) در شکل ۹-۶ آورده شده است. برای جزئیات بیشتر متن را ببینید.


GDP
GTP
GDP EF1α + Pi
EF1βγ
GTP EF1α
E
Met
P
A
60S
40S
5'
3'
(مرحله ۵)
(مرحله ۶)
(مرحله ۷)
EF2 GDP + Pi
EF2 GTP
(b)

شکل ۸-۶ (ادامه)

کارایی و صداقت توسط فاکتورهای طویل‌سازی غیرریبوزومی افزایش می‌یابد که از انرژی حاصل از هیدرولیز GTP برای تضمین قرارگیری نوع مناسب آمینوآسیل-tRNA و حرکت در طول mRNA و ملکول‌های tRNA مربوطه در داخل ریبوزوم استفاده می‌کنند.

طی طویل‌سازی تا سه ملکول tRNA به جایگاه‌های اختصاصی اتصال می‌یابند که بر روی هر دو زیرواحد قرار دارند. met-tRNA شروع‌کننده طوری قرار می‌گیرد که ریشه متیونیل آن می‌تواند به گروه α-آمینوی آزاد آمینوآسیل-tRNA ورودی انتقال یابد (یا داده شود)؛ لذا **جایگاه دهنده**[1] را اشغال می‌کند که **جایگاه پپتیدیل** یا **جایگاه P** ریبوزوم نیز نامیده می‌شود. آمینوآسیل-tRNAای که توسط کدون بعدی mRNA مشخص می‌گردد، به **جایگاه گیرنده**[2] اتصال می‌یابد که **جایگاه آمینوآسیل** یا **جایگاه A** ریبوزوم نیز نامیده می‌شود. انتخاب آمینوآسیل-tRNA صحیح توسط **فاکتور طویل‌سازی**[3] **EF1** تسریع می‌گردد. ابتدا یکی از اجزاء EF1، یعنی $EF1\alpha$، با آمینوآسیل-tRNA و GTP تولید یک کمپلکس سه‌تایی می‌کند. کمپلکس $EF1\alpha$-آمینوآسیل-GTP-tRNA به ریبوزوم اتصال یافته و در صورتی که تعاملات کدون-آنتی‌کدون صحیح باشد، آنگاه آمینوآسیل-tRNA در جایگاه A قرار داده شده، GTP هیدرولیز و کمپلکس $EF1\alpha-GDP$ جدا می‌گردد. حالا متیونیل-tRNA شروع‌کننده و آمینوآسیل-tRNA در کنار یکدیگر بر روی ریبوزوم قرار گرفته‌اند. آنتی‌کدون‌های آنها با کدون‌های متوالی mRNA در جایگاه‌های P و A زیرواحد کوچک جفت‌شده بوده و اسیدهای آمینه آنها در جایگاه پپتیدیل ترانسفراز زیرواحد بزرگ در کنار یکدیگر قرار دارند. پپتیدیل ترانسفراز حمله گروه α-آمینوی آمینوآسیل-tRNA به کربن کربنیل متیونیل-tRNA را کاتالیز می‌کند. نتیجه انتقال متیونین به گروه آمینوی آمینوآسیل-tRNA می‌باشد که در ادامه یک موقعیت «هیبرید» را بر روی ریبوزوم اشغال می‌کند که در آن آنتی‌کدون در جایگاه A زیرواحد ۴۰A قرار دارد، ولی انتهای گیرنده و پپتید اتصال‌یافته در جایگاه P زیرواحد ۶۰S می‌باشد. آنتی‌کدون tRNA دآسیله در جایگاه P زیرواحد ۴۰S قرار دارد و انتهای گیرنده آن در **جایگاه خروج**[4] یا E قرار دارد.

mRNA و دی‌پپتیدیل-tRNA موجود در جایگاه A زیرواحد ۴۰S می‌بایست موقعیت خود را تغییر داده تا دور بعدی طویل‌سازی شروع شود. این جابه‌جایی به کمک **فاکتور طویل‌سازی ۲**(EF2) انجام می‌شود که **ترانس‌لوکاز** نیز نامیده می‌شود. E2F سبب حرکت mRNA و دی‌پپتیدیل-tRNA، با تطابق کدون-آنتی‌کدون، از جایگاه A زیرواحد ۴۰S به جایگاه P می‌شود. طی این فرایند، GTP هیدرولیز شده و انرژی مورد نیاز حرکت را فراهم می‌کند؛ در نتیجه جایگاه A تخلیه می‌شود. با حرکت دی‌پپتیدیل-tRNA به جایگاه P، tRNA (متیونین) دهنده دآسیله به جایگاه E موجود بر روی زیرواحد S ۶۰ جابه‌جا می‌شود. حالا ریبوزوم می‌تواند وارد دور بعدی شود. آمینوآسیل-tRNA بعدی که توسط mRNA تعیین می‌گردد، به‌واسطه $EF1\alpha-GTP$ به جایگاه A تحویل داده شده و tRNA دآسیله

1. Donor site 2. Acceptor site 3. Elogation factor 4. Exit site

موجود در جایگاه E آزاد می‌شود. دوباره انتقال پپتید رخ می‌دهد. دورهای متوالی اتصال آمینوآسیل-tRNA، تولید پیوند پپتیدی و جابه‌جایی منجر به طویل سازی مرحله به مرحله پلی‌پپتید به سمت انتهای کربوکسیل نهایی آن می‌شود. طول زنجیر در حال رشد هر چه باشد، تولید پیوند همیشه به‌واسطه حمله گروه α-آمینوی آمینوآسیل tRNA ورودی به پیوند کربوکسیل-tRNA پپتیدی[1] انجام شده، لذا آرایش هندسی ملکول‌های واکنشگر در جایگاه پپتیدیل ترانسفراز ثابت باقی می‌ماند.

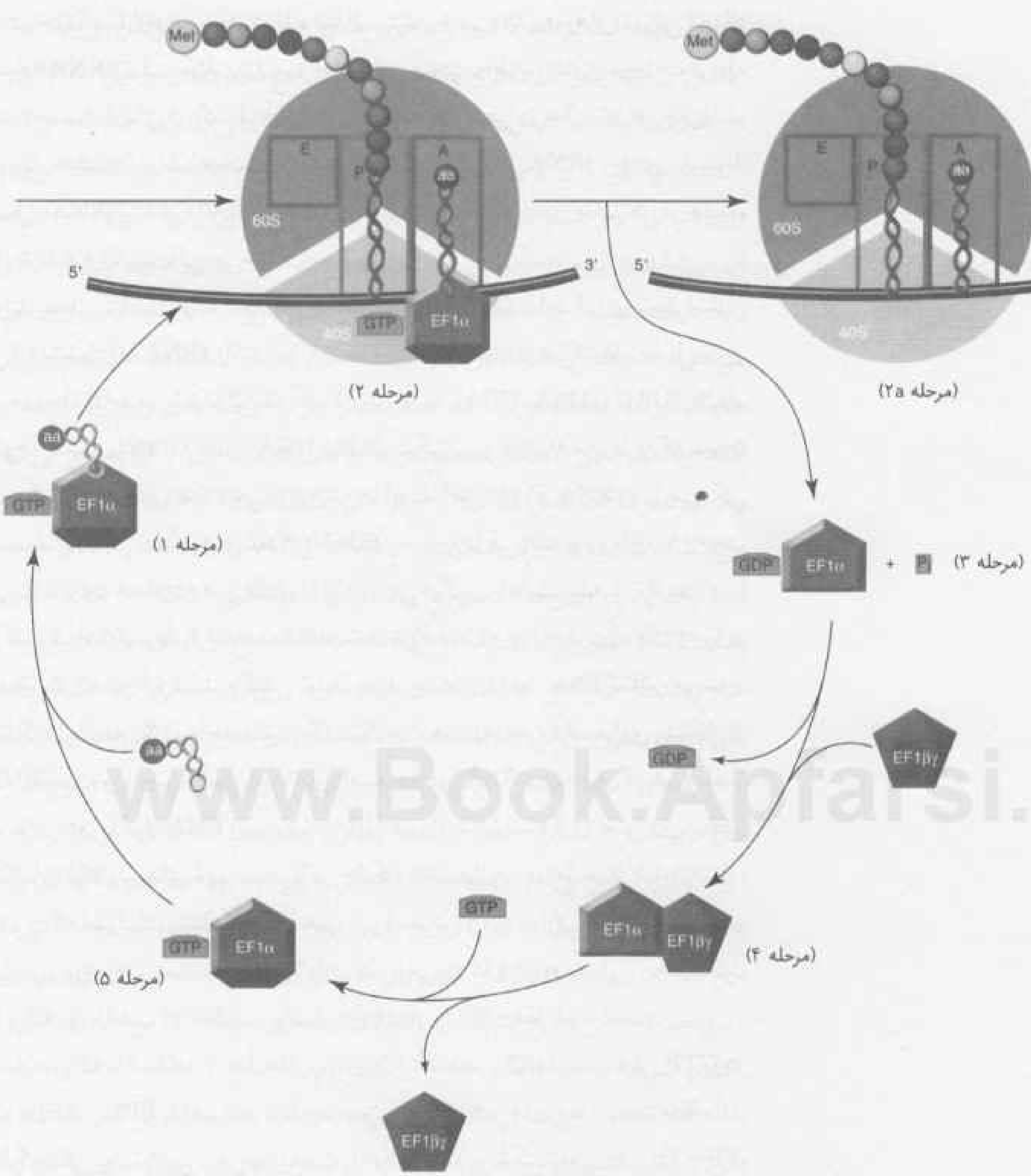
تولید پیوند پپتیدی نیاز به منبع انرژی نظیر ATP یا GTP ندارد. انرژی پیوند استری متیونیل (یا پپتیدیل) به tRNA، واکنش را به سمت تولید پیوند پپتیدی می‌کشاند. طویل سازی مرحله به مرحله ادامه می‌یابد تا این که یک کدون خاتمه (UGA، UAA و UAG) پدیدار شود. توجه داشته باشید که کدون UGA فعالیت دیگری نیز دارد که مربوط به کدنمودن **سلنوسیستئین** (sec) در تعداد کمی از پروتئین‌ها است (ص ۱۰۶). RNA ریبوزومی یکی از قسمت‌های اصلی جایگاه‌های اتصالی tRNA ریبورزوم‌ها می‌باشد و زیرواحد ۶۰S جدا شده می‌تواند بدون همکاری هیچ فاکتور غیرریبوزومی دیگری، فعالیت پپتیدیل ترانسفرازی را کاتالیز کند. شواهد مربوط به منابع مختلف نشان می‌دهند که زیرواحد بزرگ یک **ریبوزیم** پیچیده است که در آن تولید واکنش تولید پیوند پپتیدی توسط **RNA کاتالیز می‌شود**. کریستالوگرافی اشعه-X زیرواحدهای بزرگ نشان می‌دهند که ناحیه ترانسفرازی متشکل از تنها RNA است و زنجیر جانبی اسیدهای آمینه حداقل ۲۰Å دورتر قرار دارند. عناصر مربوط به هر دو ملکول RNA ریبوزومی و ناقل در واکنش ترانسفرازی نقش دارند. طی دوره تکامل، نوکلئوتیدهای مهم موجود در جایگاه ترانسفرازی عموماً حفظ شده‌اند، لذا علی‌رغم آن که مدرک کریستالوگرافیکی هنوز در دسترس وجود ندارد، معتقدند مکانیسم یکسانی در ریبوزوم‌های پستانداران وجود دارد. تصور می‌رود که ریبوزوم ابتدایی[2] یک ملکول RNA برهنه بوده است که فعالیت ترانسفرازی آن در RNA حفظ شده است.

همان‌طور که با استفاده از مدل‌های پروکاریوتی مشخص شده است، نقش GTP در فعالیت EF1α و EF2 با تغییرات کونفورماسیونی این پروتئین‌ها مرتبط است. مطالعات کریستالوگرافیکی یک نوآرایی دومن‌ها را همراه با حرکات چندین آنگسترومی را در EF-Tu، معادل پروکاریوتی EF1α، به دنبال هیدرولیز GTP نشان می‌دهند. هر دو فاکتور EF1α و EF2 به صورت کمپلکس‌های GTP به ریبوزوم‌ها اتصال می‌یابند، در حالی که کمپلکس‌های حاوی GDP راحت‌تر از ریبوزوم جدا می‌شوند. در نگاه دیگر، GTP سبب تثبیت کونفورماسیون پروتئینی می‌شود که تمایل بالایی به EF1α برای اتصال به آمینوآسیل-tRNA و ریبوزوم دارد، در حالی که GDP کونفورماسیونی را تثبیت می‌کند که تمایل کمتری برای هر کدام از آنها دارد و از اینرو امکان تحویل tRNA و جدایی EF را فراهم می‌سازد. اتخاذ مجدد

---

۱. پیوند بین tRNA و اسید آمینه از نوع «استری» است. مترجم

2. Primordial ribosome



شکل ۹-۶ **EF1 در چرخه طویل‌سازی.** مرحله ۱: کمپلکس آمینوآسیل tRNA – GTP – EF1α به ریبوزوم متصل می‌شود. مرحله ۲: آمینوآسیل-tRNA بر روی ریبوزوم قرار داده می‌شود (مرحله ۲a) که همراه با هیدرولیز GTP، تغییر در کونفورماسیون EF1α و جداشدن آن از tRNA و ریبوزوم می‌باشد (مرحله ۳). مرحله ۴: EF1βγ جایگزین GDP متصل به EF1α می‌شود. سپس GTP جایگزین EF1βγ می‌شود (مرحله ۵) و امکان اتصال EF1α با کونفورماسیون دارای بیشترین تمایل به یک آمینوآسیل-tRNA را فراهم می‌سازد (مرحله ۱).

کونفورماسیون مرتبط با $EF1\alpha$ GTP که تمایل بالایی دارد، مستلزم همکاری $EF1\beta\gamma$ است که سبب آزادسازی GDP از $EF1\alpha$ شده و یک کمپلکس $EF1\alpha-EF1\beta\gamma$ ایجاد می‌کند (شکل ۹-۶). سپس GTP سبب آزادسازی $EF1\beta\gamma$ و تولید کمپلکس $EF1\alpha-GTP$ می‌شود که می‌تواند به آمینوآسیل-tRNA و سپس ریبوزوم اتصال یابد. پروکاریوت‌ها از

مکانیسم مشابهی استفاده می‌کنند که در آن EF-Tu به GTP و آمینوآسیل-tRNA اتصال‌یافته و EF-Ts جایگزین GDP می‌شود. پروکاریوت‌ها همچنین از یک ترانس‌لوکاز وابسته به GTP، همانند EF2 استفاده می‌کنند، ولی **EF-G** یا **فاکتور G** نامیده می‌شود.

خاتمه سنتز پلی‌پپتید نیاز به کدون خاتمه دارد

وجود یک کدون خاتمه‌دهنده زنجیر UAG، UAA و UGA در جایگاه A منجر به تسریع در اتصال **فاکتور آزادسازی (eRF1)** می‌شود (شکل ۱۰-۶). پیوند استری پپتیدی-tRNA توسط پپتیدیل ترانسفراز، با عمل به‌عنوان یک هیدرولاز در اینجا، شکسته شده و پلی‌پپتید کامل‌شده از tRNA خود و ریبوزوم آزاد می‌شود. به دنبال هیدرولیز GTP اتصال‌یافته، eRF1 از ریبوزوم آزاد شده و ریبوزوم به زیرواحدهای خود تفکیک می‌گردد که قابلیت ورود مجدد به داخل فرایند سنتز پروتئین را دارد. پروتئین دیگر، یعنی eRF3، در این فرایند شرکت می‌کند. با وجود این که eRF1 یک پروتئین است، از نظر اندازه و شکل مشابه tRNA می‌باشد، و اسیدهای آمینه موجود در یک انتهای یک دومن پروتئینی، کدون خاتمه را شناسایی نموده و به آن اتصال می‌یابد. این «تقلید ملکولی[1]» همچنین در ساختمان EF-G باکتریایی وجود دارد که در آن یک دومن پروتئینی از ساقه آنتی‌کدون tRNA تقلید نموده و با جابه‌جایی tRNA از جایگاه A به جایگاه P بر روی زیرواحد کوچک فعالیت می‌کند.

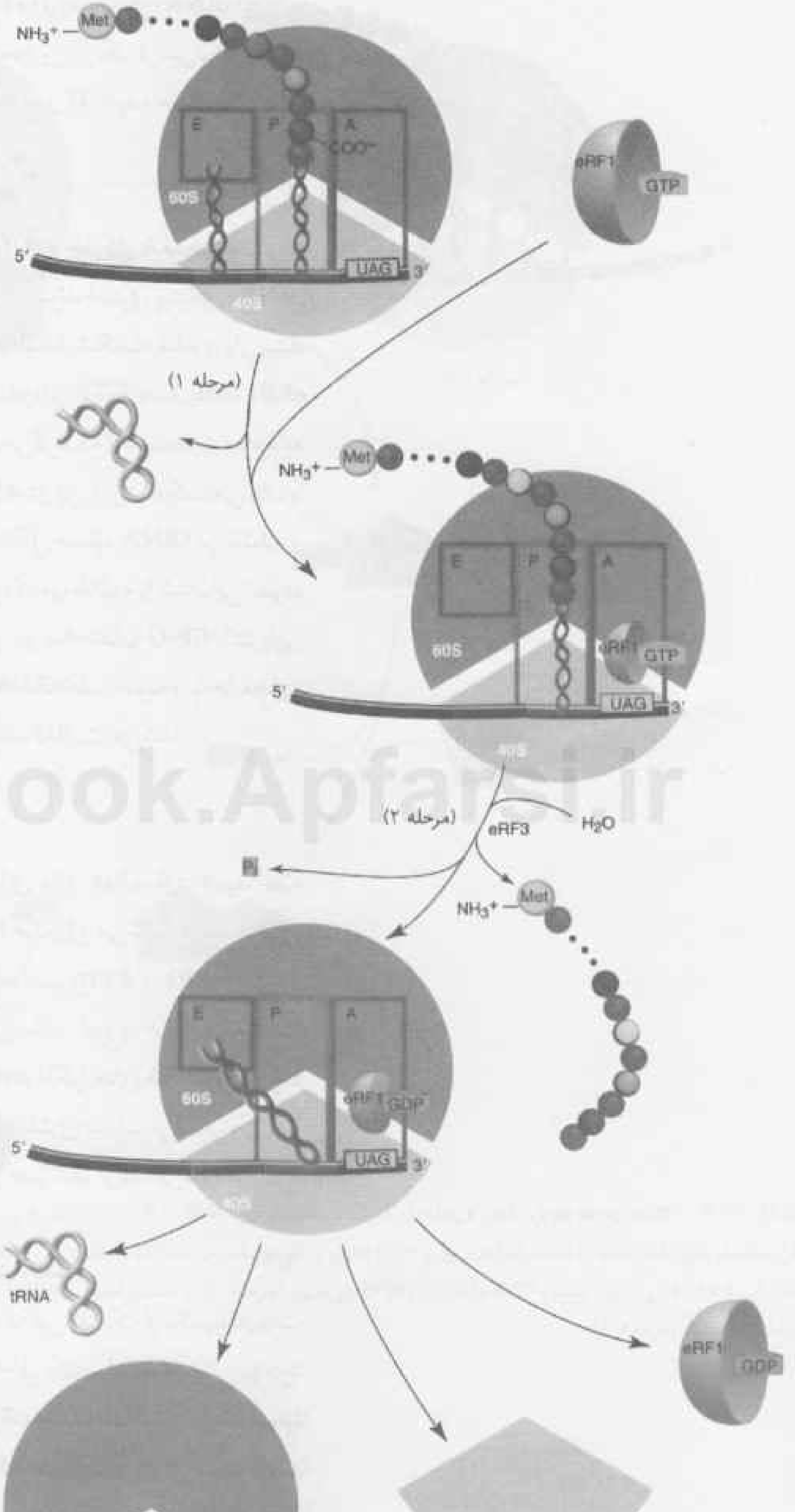
ترجمه هزینه انرژی بالایی دارد

تولید یک پلی‌پپتید نیاز به مصرف میزان قابل‌توجهی انرژی دارد. فعال‌سازی اسید آمینه سبب تبدیل ATP به AMP و پیروفسفات می‌شود که به Pi هیدرولیز می‌شود؛ هزینه خالص دو فسفات پُر-انرژی است. دو پیوند پُر-انرژی طی فعالیت $EF1\alpha$ و EF2 هیدرولیز می‌شود که جمع آنها را به چهار برای هر پیوند پپتیدی می‌رساند. شروع، خاتمه و تغییرات بعد از ترجمه به این هزینه انرژی می‌افزایند. برای تولید mRNA، ملکول‌های tRNA، ریبوزوم‌ها و فاکتورهای پروتئینی که کاربردهای متنوعی دارند، انرژی بیشتری صرف می‌شود، ولی این هزینه‌ها عموماً بین پروتئین‌هایی تقسیم می‌شود که طی عمر آنها تولید می‌گردند.

سنتز پروتئین در میتوکندری‌ها قدری متفاوت است

بسیاری از مشخصات مربوط به میتوکندری نشان می‌دهند که این اندامک از یک پروکاریوت هوازی منشاء می‌گیرد که طی یک ارتباط همزیستی در داخل یک سلول اوکاریوتی بوجود آمده است. برخی خصوصیات مستقل و پروکاریوتی این اندامک حفظ‌شده می‌باشند. با وجود این که اکثر پروتئین‌های میتوکندریایی توسط DNA هسته‌کد، در داخل سیتوپلاسم سنتز و به داخل این اندامک انتقال داده می‌شوند، سنتز پروتئین در داخل میتوکندری مهم

1. Molecular mimicry



شکل ۱۰-۶ خاتمه ترجمه. وقتی کدون خاتمه mRNA جایگاه A را اشغال می‌کند، اتصال کمپلکس RF1-GTP (مرحله ۱) رخ داده و tRNA دآسیله جدا می‌شود. مرحله ۲: پپتیدیل ترانسفراز به‌عنوان یک هیدرولاز عمل می‌کند؛ با هیدرولیز پیوند استری که پروتئین را به tRNA متصل می‌کند، پروتئین آزاد می‌گردد. انتهای گیرنده tRNA دآسیله احتمالاً جایگزین شده، GTP هیدرولیز می‌گردد و فاکتور آزادسازی -GDP آزاد می‌شود. eRF3 این وقایع را تسریع می‌کند. حالا اجزاء جداشده می‌توانند دوباره وارد دورهای بعدی سنتز پروتئین شوند.

ارتباط بالینی ۶-۶

جهش‌های مربوط به rRNA و tRNA میتوکندریایی منجر به کری به‌واسطه آنتی‌بیوتیک می‌شوند

مواردی از کری‌های دائمی حاصل مصرف مقادیری از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی نظیر استرپتومایسین، پارومومایسین و جنتامایسین بوده‌اند که به‌طورطبیعی ایمن و مؤثر می‌باشند. حساسیت غیرمعمول به آمینو-گلیکوزیدها از طریق مادر به ارث می‌رسد که نشان‌دهنده نقش یک لوکوس میتوکندریایی است (اسپرم نقشی در تأمین میتوکندری تخمک بارورشده ندارد). اهداف آمینوگلیکوزیدها، ریبوزوم‌های باکتریایی هستند، لذا منطقاً ریبوزوم میتوکندریایی باکتری-مانند محلی برای جستجوی یک جایگاه جهش‌یافته می‌باشد. در خانواده‌های مبتلا به این نوع حساسیت آمینوگلیکوزیدی شدید، یک جهش نقطه‌ای از A به G در DNA میتوکندریایی در نوکلئوتید ۱۵۵۵ ژن 12S rRNA یافت شده است. این جهش در یک ناحیه شدیداً حفظ‌شده توالی rRNA رخ می‌دهد که در اتصال آمینوگلیکوزید نقش دارد؛ برخی جهش‌ها در همین ناحیه منجر به ایجاد مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود، و این ناحیه RNA قسمتی از جایگاه رمزگشایی ریبوزومی است. احتمالاً این جهش سبب افزایش تمایل آمینوگلیکوزیدها و بنابراین توانایی آنها در مهار سنتز پروتئین می‌شود. با کاهش سنتز پروتئین‌های میتوکندریایی، میزان آنزیم‌های سیستم فسفریلاسیون اکسیداتیو کاهش یافته و سلول‌های مبتلا دچار کمبود ATP می‌شوند. جهش‌های متعدد دیگری در rRNA و tRNA میتوکندریایی با کاهش شنوایی و مشکلات دیگر همراه هستند.

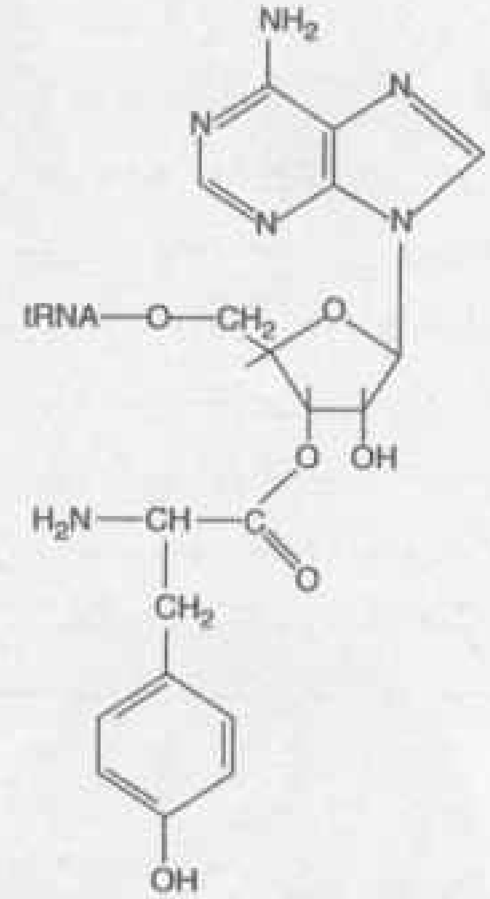
می‌باشد (ارتباط بالینی ۶-۶). میتوکندری‌های انسانی حاوی یک ژنوم DNA حلقوی با ۱۶,۵۶۹ جفت باز می‌باشد که ۱۳ پروتئین، ۲۲ نوع tRNA و rRNAهای 12S و 16S اختصاصی- میتوکندری را کد می‌کنند. برخی جزئیات مربوط به ترجمه متفاوت می‌باشند: ریبوزوم‌ها کوچکتر و ملکول‌های rRNA کوتاه‌تر از انواع موجود در سیتوزول اوکاریوتی یا پروکاریوتی هستند (جدول ۷-۶ را ببینید). کد ژنتیکی قدری متفاوت است (جدول ۲-۶ را ببینید) و همانند پروکاریوت‌ها، $Met-tRNA_i^{met}$ توسط یک **ترانس‌فرمیلاز** تغییر داده می‌شود که از N^{10}-فرمیل تتراهیدروفولات برای تولید $fMet-tRNA_i^{met}$ استفاده می‌کند. سلول‌ها می‌بایست سنتز پروتئین در داخل میتوکندری را با سنتز سیتوزولی پروتئین‌هایی که قرار است به داخل میتوکندری‌ها حمل شوند، هماهنگ کنند.

بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها سمومی برای بیوسنتز پروتئین هدف هستند

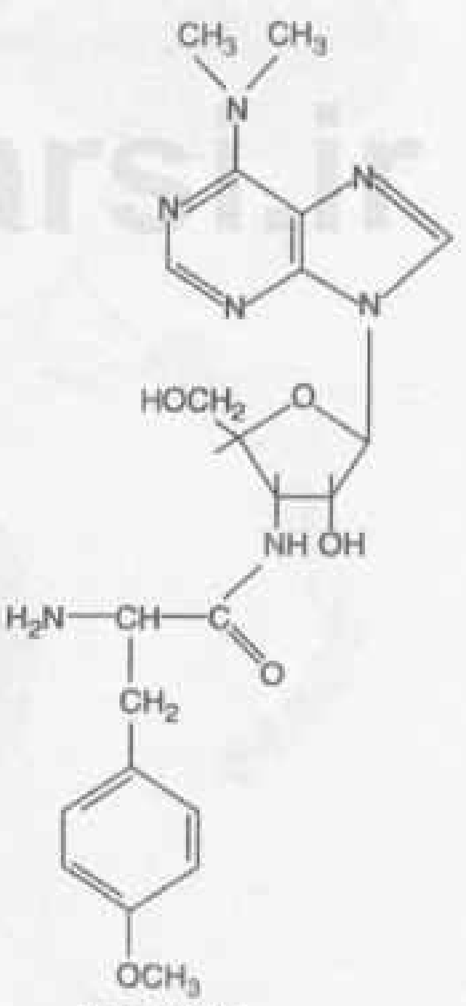
بیوسنتز پروتئین در قلب حیات و تولیدمثل سلول‌ها قرار دارد. از آنجایی که یک ارگانیسم می‌تواند از طریق تداخل با توانایی رقبای خود در سنتز پروتئین‌ها، یک مزیت بیولوژیکی به دست آورد، بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم به این طریق عمل می‌کنند. برخی برای سنتز پروتئین انتخابی هستند و به‌همین دلیل برای استفاده بالینی فوق‌العاده مفید می‌باشند. در جدول ۹-۶ مثال‌هایی فهرست شده‌اند که مکانیسم‌های متعددی را در خصوص فعالیت آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهند.

بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها با اتصال به ریبوزوم، یکی از مراحل ترجمه را مهار می‌کنند. **استرپتومایسین** با اتصال به زیرواحد کوچک ریبوزوم‌های پروکاریوتی، سبب بدخوانی[1] mRNA می‌شود (ارتباط بالینی ۶-۶). جهش در یک پروتئین ریبوزومی یا rRNA زیرواحد

1. Misreading



انتهای ۳' در tyrosyl-tRNA



Puromycin

شکل ۱۱-۶ پورومایسین (پایین) ترجمه را با اتصال به جایگاه A زیرواحد بزرگ و عمل به عنوان یک آنالوگ آمینوآسیل-tRNA (در اینجا، تیروزیل-tRNA [بالا]) خاتمه می‌دهد. گروه α-آمینو (بیکان) یک گیرنده پپتیدیل‌ترانسفرازی است و پپتیدیل-پورومایسین از ریبوزوم جدا می‌شود.

جدول ۹-۶ • برخی مهارکننده‌های آنتی‌بیوتیکی ترجمه

نوع مهارکننده	نمونه‌ها	فرآیند تحت تأثیر	محل عمل
آمینوگلیکوزیدها	استرپتومایسین نئومایسین جنتامایسین‌ها پارومایسین	صحت تعامل کدون- آنتی‌کدون	زیرواحد کوچک مرکز رمزگشایی
ماکرولیدها	اریترومایسین تلیترومایسین تیلوسین	جابه‌جایی	پپتیدیل ترانسفراز زیرواحد بزرگ
اگزازولیدین‌دیون‌ها	لینه‌زولید	تولید پیوند پپتیدی	جایگاه A زیرواحد بزرگ
تتراسیکلین‌ها	تتراسیکلین گلیسیل‌سیکلین‌ها	اتصال آمینواسیل-tRNA	جایگاه A زیرواحد کوچک
تیوپپتیدها	تیوستریتون	طویل‌سازی	مرکز GTPase زیرواحد بزرگ
آمینونوکلئوزیدها	پورمایسین	طویل‌سازی	جایگاه A زیرواحد بزرگ

کوچک می‌تواند سبب ایجاد مقاومت یا وابستگی استرپتومایسینی شود. سایر آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، نظیر **نئومایسین‌ها و جنتامایسین‌ها** با زیرواحد ریبوزومی کوچک و در محلی قدری متفاوت تعامل نموده و سبب بدترجمه[1] می‌شوند. **اریترومایسین** که یک آنتی‌بیوتیک ماکرولیدی است، با جابه‌جایی بر روی ریبوزوم‌های پروکاریوتی تداخل می‌کند. ماکرولیدها مانع عبور پپتید در حال طویل‌سازی از میان ریبوزوم می‌شود. **کازوگامایسین**[2] مانع شروع ترجمه می‌شود؛ حساسیت به کازوگامایسین بستگی به متیلاسیون بازی دارد که به‌طور طبیعی بر روی دو آدنین مجاور یک rRNA زیرواحد کوچک رخ می‌دهد. **تتراسیکلین‌ها** به ریبوزوم‌ها اتصال یافته و مانع اتصال آمینوآسیل-tRNA می‌شوند. **پورومایسین** (شکل ۱۱-۶) مشابه یک آمینوآسیل-tRNA است؛ این ترکیب به جایگاه A در زیرواحد بزرگ اتصال یافته و به‌عنوان گیرنده پپتید در حال رشد در واکنش پپتیدیل ترانسفراز عمل می‌کند. پپتیدیل-پورومایسین جابه‌جا نشده و نمی‌تواند به عنوان یک دهنده پپتیدی عمل کند. ترجمه به‌طور نارس خاتمه می‌یابد و پپتیدیل-پورومایسین آزاد می‌شود. کلرامفنیکل از طریق اتصال به مرکز ترانسفراز، فعالیت پپتیدیل ترانسفراز را مهار می‌کند؛ انتقالی صورت نگرفته و پپتیدیل-tRNA متصل به ریبوزوم باقی می‌ماند.

1. Mistranslation 2. Kasugamycin

برخی عوامل مستقیماً بر روی RNA ریبوزومی عمل می‌کنند. **ریسین**[1] (از کرچک[2]) و سموم مرتبط با آن، *N*–گلیکوزیدازهایی هستند که یک آدنین را در اسکلت rRNA زیرواحد بزرگ می‌شکنند. سم قارچی **α– سارسین**[3] rRNA زیرواحد بزرگ را در یک محل می‌شکند؛ در هر دو حالت ریبوزوم غیرفعال می‌شود. برخی سوش‌های ***E.coli*** تولید سموم خارج سلولی می‌کنند که بر روی باکتری‌های دیگر موثر هستند. یکی از اینها **کولیسین E3**[4] است که به‌عنوان یک ریبونوکلئاز سبب تجزیه ۱۶SrRNA در نزدیکی توالی اتصال به mRNA محل رمزگشایی می‌شود؛ این سم سبب مهار زیرواحد کوچک و توقف سنتز پروتئین در رقبای سلول تولیدکننده کولیسین می‌شوند. عوامل دیگر بر روی فاکتورهای ترجمه اثر می‌کنند: برای مثال، جابه‌جایی اوکاریوتی توسط سم دیفتری مهار می‌شود که یک پروتئین تولیدی توسط ***Corynebacterium diphtheria*** می‌باشد. این سم به غشاء سلولی اتصال یافته و یک زیر واحد بعد از ورود به داخل سلول، ADP–ریبوزیلاسیون و غیرفعال‌سازی EF2 را طی واکنش زیر کاتالیز می‌کند.

$$\underset{\text{(فعال)}}{EF-2} + NAD \rightleftharpoons \underset{\text{(غیرفعال)}}{ADP-ribosyl\,EF-2} + nicotinamide + H^+$$

ADP–ریبوز به یک ریشه **دیفتامید**[5] در EF2 اتصال می‌یابد که خود شکل تغییریافته هیستیدین بعد از ترجمه می‌باشد (شکل ۲۰–۶ را ببینید). *Pseudomonas aeruginosa* اگزوتوکسین مشابهی را تولید می‌کند.

۴–۶ • بلوغ پروتئینی: تاشدن، تغییر، ترشح و هدفمندسازی

برخی پروتئین‌هایی که از ریبوزوم خارج می‌شوند، آماده فعالیت هستند؛ در حالی که سایر پروتئین‌ها متحمل انواع مختلفی از **تغییرات بعد از ترجمه** می‌شوند. نتیجه این تغییرات ممکن است تولید یک شکل وظیفه‌دار، هدایت به یک بخش تحت‌سلولی اختصاصی، ترشح به خارج سلول و یا تغییر در فعالیت یا پایداری باشد. اطلاعاتی که سرنوشت بعد از ترجمه یک پروتئین را تعیین می‌کند، نهایتاً در ساختمان آن قرار دارد؛ توالی و کونفورماسیون پروتئین تعیین می‌کند که این پروتئین به عنوان سوبسترایی برای یک آنزیم تغییردهنده باشد و یا برای آن یک موقعیت تحت‌سلولی یا خارج‌سلولی مشخص گردد.

چاپرون‌ها به تاشدن پروتئین کمک می‌کنند

بسیاری از پروتئین‌ها می‌توانند به‌طور خود به‌خودی تولید کونفورماسیون بومی خود را به دست آورند. برای مثال، ریبونوکلئاز پانکراس که به‌طور کامل دناتوره شده است، تحت شرایط آزمایشگاهی مناسب، دوباره تاشده و پل‌های دی‌سولفیدی صحیح را به همراه فعالیت کامل

1. Ricin 2. Castor bean 3. α-Sarcin 4. Colicin E3 5. Diphthamide

ارتباط بالینی ۷-۶

حذف یک کدون، تاشدن غلط و تخریب نارس: فیبروزکیستیک

فیبروز کیستیک (CF) شایع‌ترین بیماری اتوزومال مغلوب در میان قفقازی‌ها، با فراوانی حدود ۱ در ۲۰۰۰، می‌باشد. ژن CF شامل ۲۳۰ kb طول و ۲۷ اگزون است که یک پروتئین ۱۴۸۰ اسید آمینه‌ای راکد می‌کند. این پروتئین که تنظیم‌کننده هدایت ترانس‌ممبران فیبروز کیستیک[1] یا CFTR (ص. ۶۷۴) نامیده می‌شود، یک کانال کلری تحت تنظیم cAMP است. این پروتئین دو دومن پل‌زننده بر روی غشاء دارد که هر کدام حاوی شش ناحیه ترانس ممبران، دو دومن اتصال به ATP و یک دومن تنظیمی است که چندین جایگاه فسفریلاسیون دارد. مسیر تاشدن پیچیده آن تحت تأثیر چند چاپرون قرار می‌گیرد. اپی‌تلیوم CF با نقص در انتقال الکترولیت‌ها مشخص می‌شود. اعضایی که بیشتر تحت تأثیر قرار می‌گیرند شامل ریه‌ها، پانکراس و کبد می‌باشند و بیشترین تهدید برای ادامه حیات به‌واسطه ترشحات موکوسی ضخیمی به‌وجود می‌آید که منجر به بیماری ریوی انسدادی مزمن و تداوم عفونت‌های ریوی می‌شود. حدود ۷۰٪ بیماران یک حذف سه نوکلئوتیدی دارند که فنیل‌آلانین ۵۰۸ را کد نموده و به‌طور طبیعی در دومن اتصال به ATP ۱ در سمت سیتوپلاسمی غشاء پلاسمایی قرار دارد. همانند چندین جهش دیگر CF، پروتئین با حذف فنیل‌آلانین ۵۰۸، به شکل صحیحی در ER تا نشده و به شکل مناسبی گلیکوزیله یا به سطح سلول منتقل نمی‌شود. در عوض، در داخل سیتوپلاسم تخریب می‌گردد. با این وجود در سلول‌های کشت‌شده در درجه حرارت‌های پایین‌تر یا با افزودن چاپرون‌های شیمیایی نظیر گلیسرول، پروتئین جهش‌یافته تاشده، انتقال یافته و به‌خوبی فعالیت می‌کند. داروهایی که تعاملات چاپرونی را با CFTR جهش‌یافته افزایش می‌دهند و یا به تاشدن و انتقال آن به غشاء کمک می‌کنند، رهیافت‌های درمانی بالقوه این شکل فیبروز کیستیک هستند.

1. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

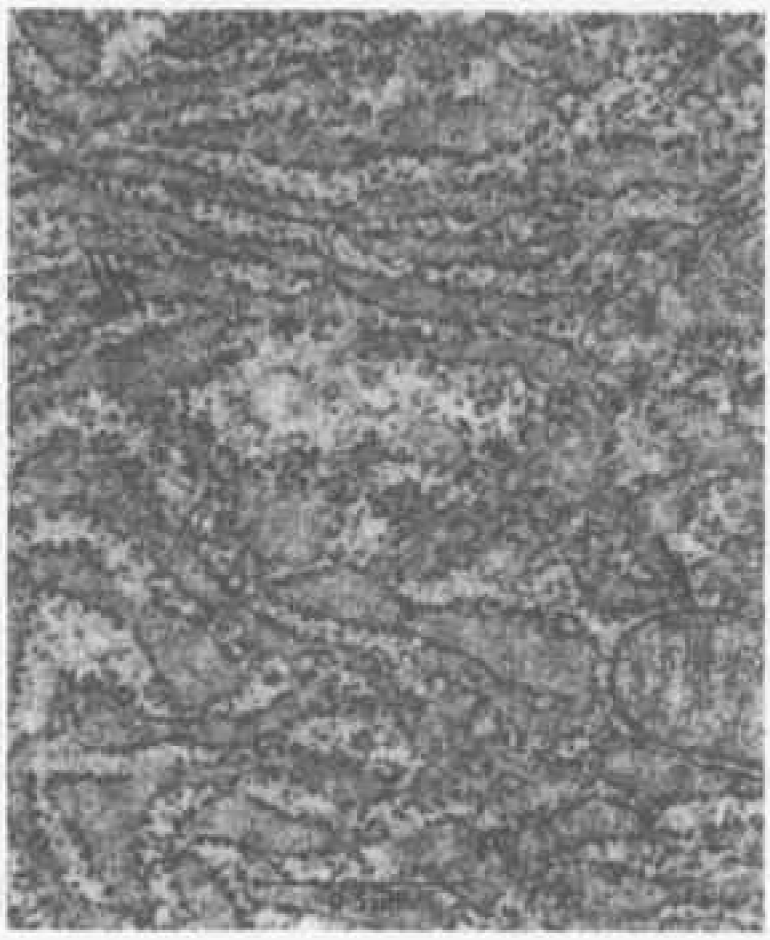
تولید می‌کند. بسیاری از پروتئین‌هایی که به تازگی سنتز شده‌اند، با خروج از ریبوزوم، به شکل صحیحی تا می‌شوند. هرچند، پروتئین‌های دیگر نیاز به کمک **چاپرون‌ها**[1] (ص. ۱۵۷) دارند که به‌طور برگشت‌پذیر به نواحی آبگریز پروتئین‌های تازه‌ساز و پروتئین‌هایی که در یک مرحله حدواسط تاشدن قرار دارند، اتصال می‌یابند. فعالیت چاپرون‌ها به یک پروتئین کمک می‌کند تا کونفورماسیون وظیفه‌دار خود را بدست آورد. چاپرون‌ها می‌توانند ترکیبات واسط را پایدار نموده و تاشدن صحیح را تسریع کنند، پروتئین‌ها را در یک حالت تانشده حفظ کنند تا بتوانند از غشاءها عبور نمایند، به قطعات بدتاشده[2] کمک می‌کنند تا باز شوند، مانع تولید ترکیبات واسطی می‌شوند که تاخوردگی غلط دارند، و مانع ایجاد تجمعات[3] و سایر تعاملات نامناسب با پروتئین‌های دیگر می‌شوند. همچنین آنها می‌توانند به بازشدن پروتئین‌هایی کمک کنند که قرار است تخریب شوند. بعضی از چاپرون‌ها از هیدرولیز ATP برای انجام فعالیت‌های خود استفاده می‌کنند. نارسایی در تاشدن صحیح معمولاً منجر به تخریب سریع پروتئین می‌شود (ارتباط بالینی ۷-۶). انباشتگی[4] پروتئین‌های بدتاشده می‌تواند منجر به تجمع پروتئینی و بیماری جدی شود (ارتباط بالینی ۱۴-۶).

پروتئین‌ها برای انتقال به خارج سلول، مسیر ترشحی را دنبال می‌کنند

پروتئین‌هایی که قرار است به خارج سلول ترشح شوند و یا آنهایی که مقصدشان غشاء پلاسمایی، لیزوزوم‌ها، آندوزوم‌ها یا دستگاه گلژی است، بر روی ریبوزوم‌های متصل به

1. Chaperones 2. Misfold 3. Aggregations 4. Accumulation

غشاء **شبکه آندوپلاسمی (ER) خشن** سنتز می‌شوند (شکل ۱۲-۶). این پروتئین‌ها یک **پپتید پیام**[1] آبگریز دارند که معمولاً در یا نزدیک به انتهای آمینو می‌باشد. پپتیدهای پیام یک ناحیه با بار مثبت انتهای آمینو، یک هسته متشکل از ۸ تا ۱۲ اسید آمینه آبگریز به شکل مارپیچ α و به دنبال آن یک قطعه قطبی‌تر انتهای کربوکسیل می‌باشند که نهایتاً به‌عنوان محل شکست جهت جدانمودن پپتید پیام عمل می‌کند. ترجمه بر روی ریبوزوم‌های آزاد سیتوزولی آغاز می‌شود. با خروج پپتید پیام ۳۰-۱۵ اسید آمینه‌ای از ریبوزوم، این پپتید به یک **ذره شناسایی پیام**[2] **(SRP)** اتصال می‌یابد (شکل ۱۳-۶). SRP متشکل از شش پروتئین مختلف و یک ملکول RNA (7S) است. پپتید پیام طوری در داخل یک پاکت آبگریز SRP اتصال می‌یابد که قطعه انتهای آمینوی دارای بار مثبت در تماس با SRP RNA باشد. ترجمه متوقف می‌شود: کمپلکس به GTP اتصال یافته و به سمت ER حرکت می‌کند؛ در این محل، SRP به کمپلکس GTP یک گیرنده SRP یا **پروتئین لنگراندازی**[3]، در سطح سیتوزولی غشاء ER، اتصال می‌یابد. ریبوزوم نیز به یک **ترانس لوکون**[4] متصل می‌شود که یک گیرنده ریبوزومی است و با عبور از غشاء، به‌عنوان یک مسیر عبوری از میان غشاء عمل می‌کند. GTP هیدرولیز و SRP آزاد می‌شود که نتیجه آن برداشت اثر مهاری بر روی ترجمه می‌باشد. مسیر ترانس‌لوکون باز شده و امکان انتقال پروتئین تازه‌ساز فراهم می‌گردد، توالی پیام آبگریز در داخل مسیر قرار داده شده و حالا ترجمه با امتداد در میان ترانس لوکون جفت می‌شود. حتی قطعات بسیار آبدوست یا باردار نیز از میان غشاء عبور داده شده و وارد مجرای ER می‌شوند. پیوندهای دی‌سولفیدی می‌توانند با همکاری تیول اکسیدو-ردوکتازها تشکیل شده و ممکن است اجزاء چند-زیرواحدی پروتئین‌ها همایش یابند. (یک نگاه دقیق‌تر ۳-۶) پپتید پیام توسط **پپتیداز پیام** شکسته می‌شود که یک پروتئین غشاء داخلی در سطح مجرایی ER می‌باشد. مراحل دیگر ممکن است شامل پردازش پروتئولیتیک و گلیکوزیلاسیون باشند که در داخل مجرای ER و طی انتقال پروتئین از میان دستگاه گلژی و به داخل وزیکول‌های ترشحی رخ می‌دهند.



شکل ۱۲-۶ شبکه آندوپلاسمی خشن. سه پیکان موازی سه ریبوزوم را در میان تعداد زیاد اتصال‌یافته به غشاءها نشان می‌دهند. پیکان تکی یک میتوکندری را برای مقایسه نشان می‌دهد.

یک نگاه دقیق‌تر ۳-۶

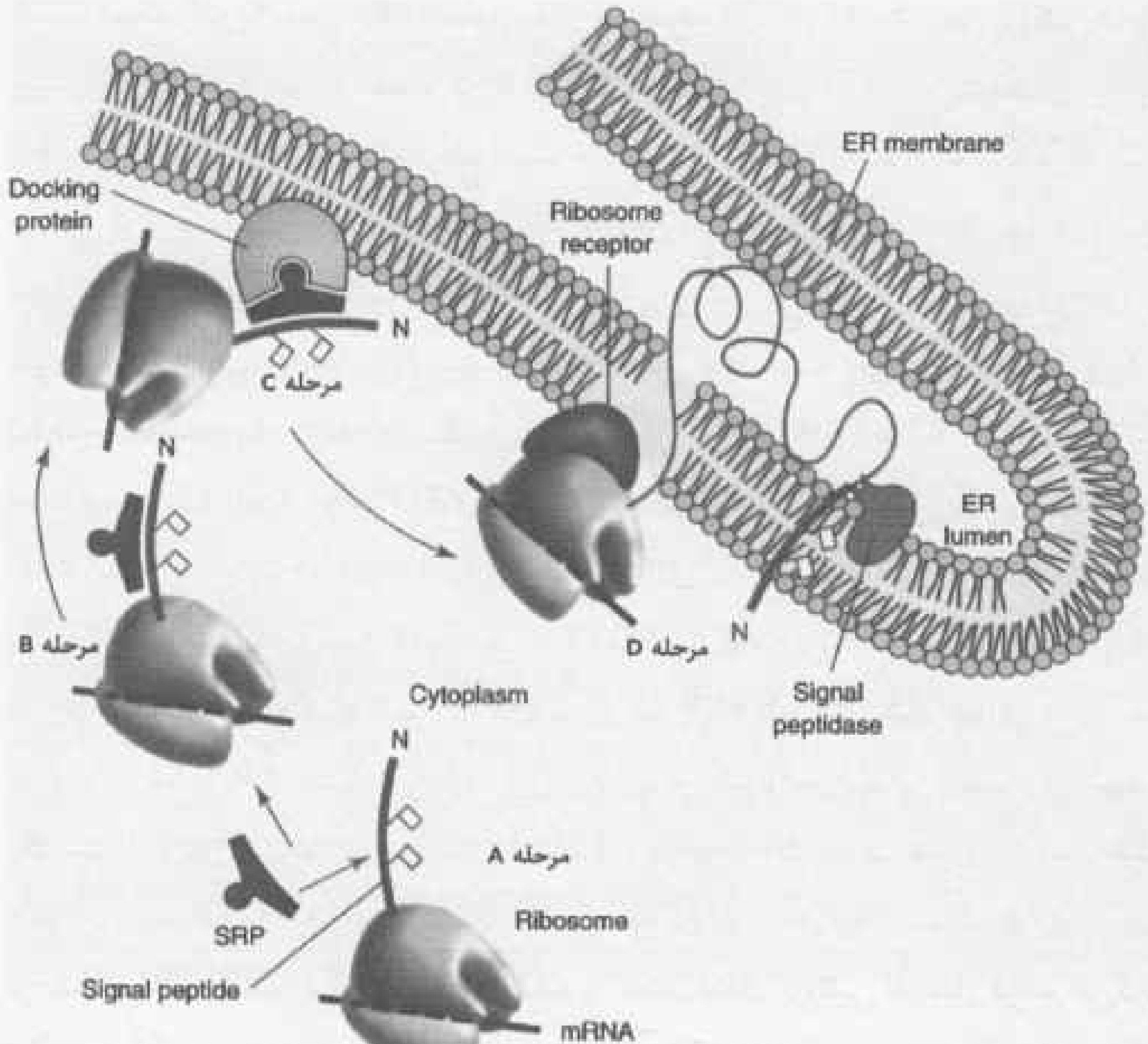
چاپرون‌های موجود در شبکه آندوپلاسمی

خانواده چاپرونی	عملکرد
Hsp۴۰	کمک به Hsp۷۰
Hsp۷۰	تاشدن عمومی پروتئین در ER
Hsp۹۰	تاشدن عمومی پروتئین در ER
Hsp۱۰۰	نامشخص
GrpE- مانند	کمک به Hsp۷۰
لکتین‌ها	تاشدن گلیکوپروتئین
افساربند به ریبوزوم	کمک به Hsp۷۰
PDI	تولید پیوند دی‌سولفیدی
PPI	سیس-ترانس ایزومریزاسیون پپتیدیل-پرولین
بقیه	تاشدن پروتئین‌های اختصاصی

گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی رخ می‌دهد

گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در جهت تولید گلیکوپروتئین‌ها (ص ۱۵۲) به دلایل متعددی مهم می‌باشد. گلیکوزیلاسیون سبب تغییر خصوصیات پروتئین‌ها، شامل پایداری، حلالیت و توده فیزیکی، می‌شود. بخش‌های کربوهیدراتی می‌توانند پیام‌های شناسایی برای هدایت تعاملات و هدفمندسازی پروتئینی باشند. جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون توسط اسید آمینه و توالی مجاور آن در پروتئین تعیین می‌شود. **گلیکوزیل ترانسفرازها** که برخی از کلاس‌های آنها در جدول ۱۰-۶ خلاصه شده‌اند، همگی یک واکنش پایه مشابه را کاتالیز می‌کنند. یک قند از یک سوبسترای دهنده فعال‌شده به یک گیرنده مناسب، معمولا ریشه قندی

1. Signal peptide   2. Signal recognition particle   3. Docking protein   4. Translocon



شکل ۱۳-۶ مسیر ترشحی، شناسایی پپتید پیام. مرحله A: پپتید پیام آبگریز از یک ریبوزوم آزاد موجود در سیتوزول آزاد می‌شود. مرحله B: ذره شناسایی پیام (SRP) به پپتید پیام اتصال یافته و طویل‌سازی به‌طور موقتی متوقف می‌شود. مرحله C: ریبوزوم به سمت غشاء ER می‌رود و در آنجا پروتئین لنگری به SRP اتصال می‌یابد. مرحله ۴: ریبوزوم به گیرنده (یا ترانس‌لوکون) اتصال می‌یابد، طویل‌سازی از سر گرفته می‌شود، و پروتئین تازه‌سنتز از میان غشاء عبور کرده و وارد مجرای ER می‌شود.

جدول ۱۰-۶ • گلیکوزیل ترانسفرازهای موجود در سلول‌های اوکاریوتی

Glycosyltransferase	دهنده	مخفف	قند انتقالی
Mannosyltransferase	GDP-Man	Man	Mannose
	Dolichol-Man		
Galactosyltransferase	UDP-Gal	Glc	Galactose
Glucosyltransferase	UDP-Glc	Glc	Glucose
	Dolichol-Glc		
Fucosyltransferase	GDP-Fuc	Fuc	Fucose
N-acetylgalactosaminyltransferase	UDP-GalNac	GalNAc	*N*-Acetylgalactosamine
N-acetylglucosaminyltransferase	UDP-GlcNAc	GlcNAc	*N*-Acetylglucosamine
N- Acetylneuraminyltransferase	CMP-NANA	NANA or NeuNAc	*N*-Acetylneuraminic acid
(sialyltransferase)	CMP-SA	SA	(or sialic acid)

دیگری که قسمتی از یک اولیگوساکارید در حالت ساخت می‌باشد، انتقال داده می‌شود. این آنزیم‌ها ویژگی‌هایی را برای **منوساکاریدی** که انتقال می‌دهند، ساختمان و توالی گیرنده، و محل و کونفیگوراسیون **اتصال آنومری** تولیدی، نشان می‌دهند.

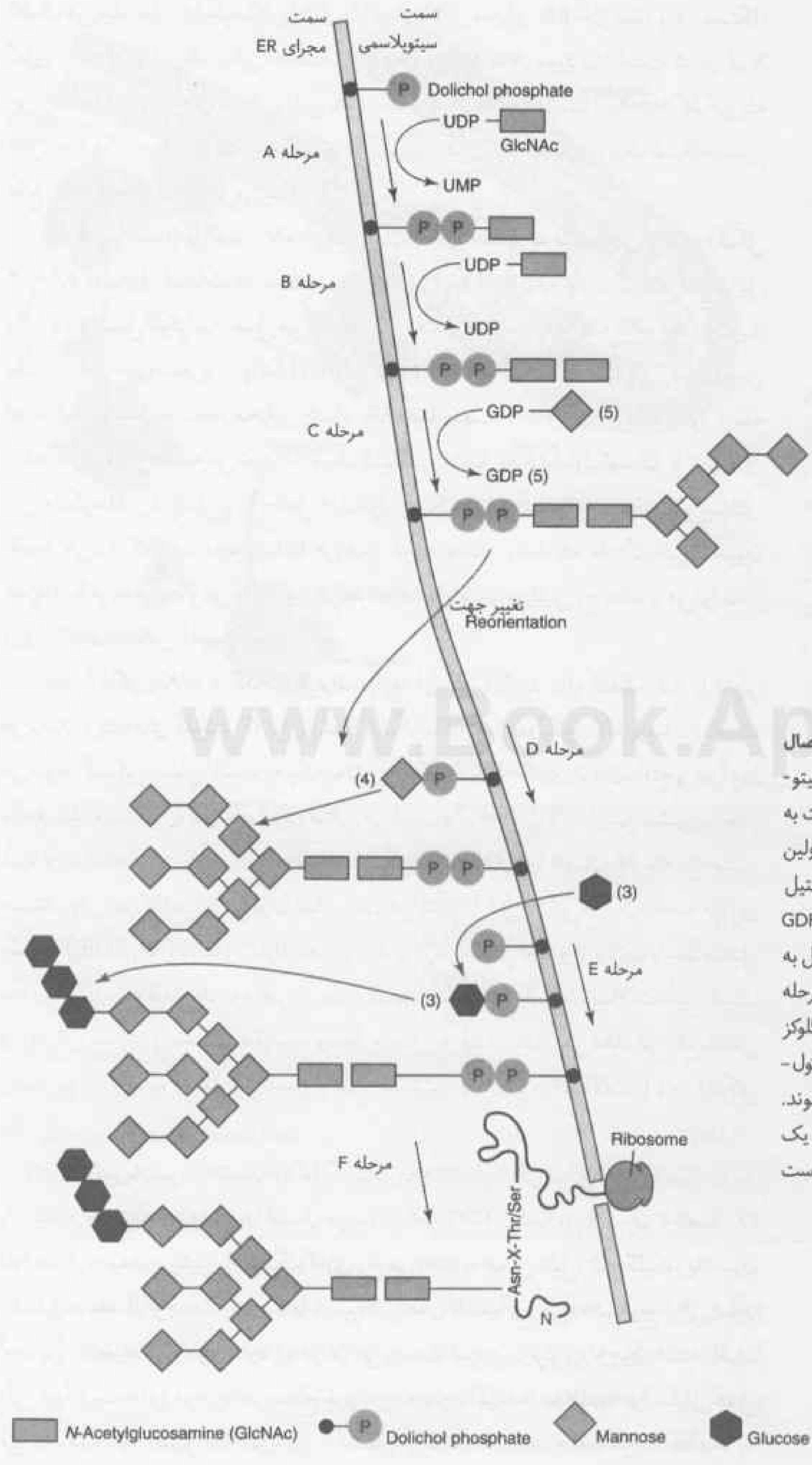
در **گلیکوزیلاسیون با اتصال N** یک اولیگوساکارید از طریق یک نیتروژن آمیدی آسپاراژین

اتصال می‌یابد. تولید اولیگوساکاریدهای با اتصال N در مجرای ER آغاز شده و در دستگاه گلژی ادامه می‌یابد. یک توالی اختصاصی، **Asn-X-Thr (Ser)**، مورد نیاز است که در آن X می‌تواند هر اسید آمینه‌ای غیر از پرولین باشد. تمامی توالی‌های **Asn-X-Thr/Ser** گلیکوزیله نمی‌شوند، زیرا برخی از آنها برای تغییر در دسترس قرار ندارند. آنتی‌بیوتیک تونیکامایسین مانع *N*–گلیکوزیلاسیون می‌شود.

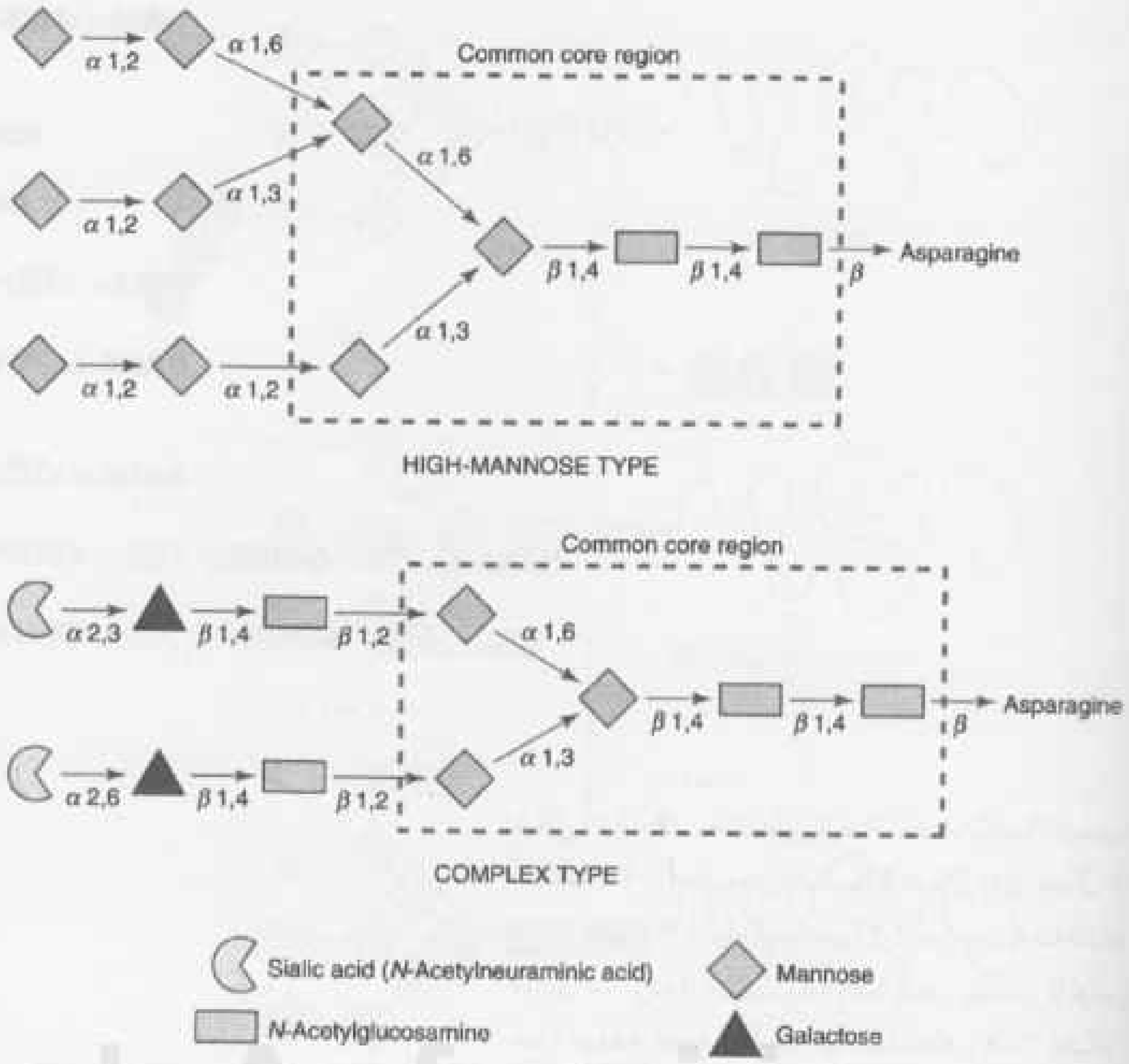
گلیکوزیلاسیون با اتصال N، با یک ترکیب واسط متصل به لیپید آغاز می‌شود (شکل ۱۴-۶). **دولیکول فسفات** در سطح سیتوپلاسمی غشاء ER به‌عنوان گیرنده گلیکوزیل برای *N*–استیل‌گلوکزآمین عمل می‌کند. گلیکوزیلاسیون مرحله به مرحله ادامه یافته تا تولید یک دولیکول-پیروفسفریل-$(GlcNAc)_2$ $(Man)_5$ منشعب در سمت سیتوزولی شود. سپس این ترکیب واسط به سطح مجرایی غشاء ER تغییر جهت داده و چهار ریشه مانوز و سه ریشه گلوکز دیگر اضافه می‌شود. آنگاه یک کمپلکس متصل به غشاء اولیگوساکاریل‌ترانسفراز این اولیگوساکارید کامل را از حامل دولیکول به یک ریشه آسپاراژین زنجیر پلی‌پپتیدی اضافه می‌کند که وارد مجرای ER می‌شود. توجه داشته باشد که *N*–گلیکوزیلاسیون **همزمان با ترجمه** انجام می‌شود؛ این فرایند در هنگام سنتز پروتئین رخ داده و می‌تواند بر روی تاشدن پروتئین تأثیر بگذارد.

حال **گلیکوزیدازها** و **گلیکوزیل‌ترانسفرازها** اولیگوساکارید تازه انتقال‌یافته را تغییر می‌دهند. ریشه‌های گلوکزی که برای انتقال اولیگوساکارید از دولیکول لازم بودند، برداشت می‌شوند. گلیکوپروتئین تاشده به یک بخش حدواسط ER–گلژی انتقال یافته و در آنجا دسته‌بندی و سپس به دستگاه گلژی منتقل می‌گردد. حال احتمال دارد آرایش بیشتری انجام شود و یا قندهای دیگری اضافه شوند. اولیگوساکاریدهای با اتصال N حاصل متنوع هستند، ولی دو کلاس را می‌توان تمایز داد. هر کدام از این کلاس‌ها یک ناحیه مرکزی مشترک ($GlcNAc_2Man_3$) را دارند که به یک آسپاراژین متصل بوده و از ترکیب واسط متصل به دولیکول ریشه گرفته‌اند. نوع غنی از مانوز شامل ریشه‌های مانوز با اتصالات متنوع است و پردازش کمتری را نسبت به ترکیب واسط متصل به غشاء نشان می‌دهد. نوع کمپلکس بیشتر پردازش شده و متنوع‌تر است و تنوع بیشتری از قندها و اتصالات را دارد (شکل ۱۵-۶).

در **گلیکوزیلاسیون با اتصال O**، اولیگوساکاریدها از طریق گروه‌های هیدروکسیل سرین یا ترئونین موجود در پروتئین‌ها اتصال می‌یابند (ص.۱۵۲). گلیکوزیلاسیون با اتصال O تنها بعد از رسیدن پروتئین به دستگاه گلژی رخ می‌دهد؛ به‌همین دلیل، *O*–گلیکوزیلاسیون یک فرایند **بعد از ترجمه** است و تنها در پروتئین‌های تاشده رخ می‌دهد. هیچ توالی اسید آمینه‌ای اختصاصی وجود ندارد که در آن می‌بایست سرین یا ترئونین وجود داشته باشد، ولی تنها ریشه‌های موجود در سطح پروتئین به‌عنوان گیرنده **GalNAc–ترانسفراز** عمل می‌کنند که *N*–استیل‌گالاکتوزآمین را متصل می‌کند. افزودن مرحله به مرحله قندها به



شکل ۱۴-۶ بیوسنتز اولیگوساکاریدهای دارای اتصال N در شبکه آندوپلاسمی. مرحله A: سنتز در سمت سیتوپلاسمی غشاء ER با انتقال *N*-استیل گلوکز آمین فسفات به یک گیرنده دولیکول آغاز می‌شود. مرحله B: تولید اولین پیوند گلیکوزیدی قند به قند با انتقال یک ریشه *N*-استیل گلوکز آمین رخ می‌دهد. مرحله C: پنج ریشه مانوز (از GDP مانوز) به‌طور متوالی اضافه شده و اولیگوساکارید متصل به لیپید به سمت مجرایی غشاء تغییر جهت می‌دهد. مرحله D: مانوز دیگری اضافه شده و (مرحله E) ریشه‌های گلوکز از ترکیبات واسط متصل به دولیکول منتقل می‌گردد. دولیکول-قندها از قندهای نوکلئوزید دی‌فسفاتی تولید می‌شوند. مرحله F: اولیگوساکارید تکمیل‌شده در سطح غشاء به یک پلی‌پپتید درحال رشد انتقال می‌یابد؛ پپتید پیام ممکن است تا به حال در این نقطه شکسته شده باشد.



شکل ۱۵-۶ ساختمان اولیگوساکاریدهای دارای اتصال N. انواع پایه اولیگوساکاریدهای دارای اتصال N نشان داده شده‌اند. هر ساختمان با عمل گلیکوزیدازها و گلیکوزیل‌ترانسفرازها از اولیگوساکارید متصل به دولیکول ابتدایی مشتق می‌شوند. به تنوع اتصالات گلیکوزیدی درگیر توجه نمایید.

گیرنده GalNAc ادامه می‌یابد. اولیگوساکاریدهای تولیدی بستگی به نوع و میزان گلیکوزیل ترانسفرازهای موجود در یک سلول خاص دارد. در صورتی که گیرنده سوبسترایی برای بیش از یک ترانسفراز باشد، آنگاه میزان هر ترانسفراز بر روی رقابت بین آنها تأثیر می‌گذارد. رشد اولیگوساکارید زمانی متوقف می‌گردد که ساختمان‌هایی تولید شود که گیرنده‌هایی برای هیچکدام از گلیکوزیل‌ترانسفرازهای موجود نیستند. بدین‌ترتیب امکان تولید ساختمان‌های اولیگوساکاریدی مختلف بر روی پلی‌پپتیدهایی وجود دارد که از نظر خصوصیات دیگر یکسان هستند؛ لذا **هتروژنیتی** در گلیکوپروتئین‌ها معمول است (شکل ۱۶-۶).

۵-۶ • هدفمندسازی غشایی و اندامکی

انتقال پروتئین از ER به دستگاه گلژی و از میان آن به مقاصد بعدی، با استفاده از وزیکول‌های حامل چندپروتئینی انجام می‌شود. تنها پروتئین‌هایی به‌عنوان بار[1] برای انتقال شناسایی می‌شوند که به شکل صحیح تا شده‌اند و هر دو نوع چاپرون‌های عمومی و اختصاصی-پروتئین در ER به تاشدن پروتئینی کمک نموده و ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی صحیح را مساعدت می‌کنند. شبکه‌های چاپرونی همچنین در مسیر انتقال ER- گلژی برای شناسایی پروتئین‌های بدتاشده یا آسیب‌دیده در «نقاط وارسی[2]» عمل می‌کنند که برای تخریب طی

1. Cargo 2. Checkpoints



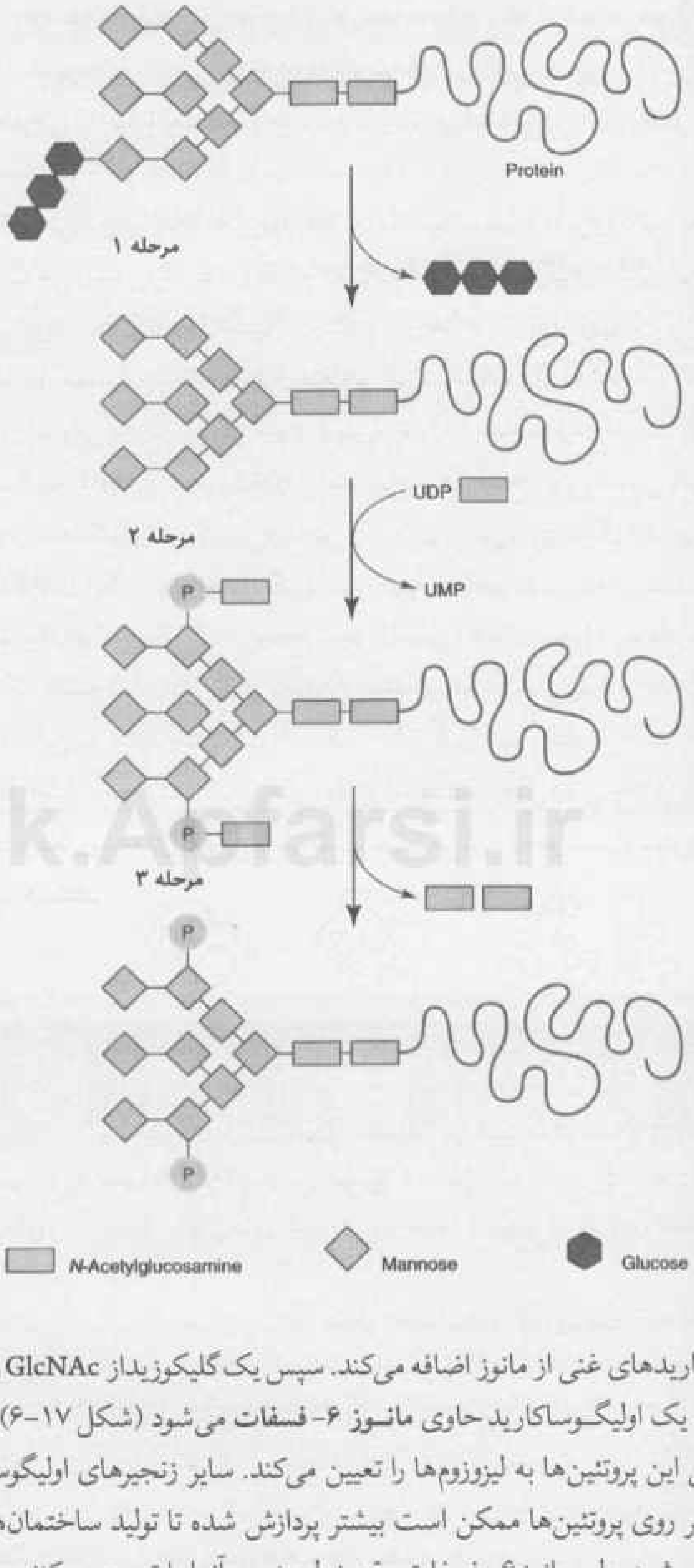
شکل ۱۶-۶ مثال‌هایی از ساختمان اولیگوساکاریدی. ساختمان ۳-۱ مخصوص اولیگوساکاریدهای دارای اتصال N غنی از مانوز (۱) و انواع کمپلکس (۲،۳) هستند، به ساختمان مرکزی مشترک از محل ریشه آسپارازین پروتئین تا اولین نقطه شاخه توجه نمایید. ساختمان‌های ۸-۴ اولیگو-ساکاریدهای معمولی هستند که ممکن است ساده یا شدیداً کمپلکس باشند. توجه داشته باشید با وجود این که این ساختمان مرکزی (Gal NAc-Ser/Thr) برخلاف اولیگوساکارید دارای اتصال N است، انتهاها می‌توانند کاملاً مشابه باشند (برای مثال، ساختمان‌های ۲ و ۶، ۳، و ۷). مخففها: Man = مانوز؛ Gal = گالاکتوز، Fuc = فوکوز، GlcNAc = N-استیل-گلوکزآمین؛ GalNAc = N-استیل‌گالاکتوزآمین، و NANA = N-استیل‌نورامینیک اسید (اسید سیالیک).

فرایندی به‌نام **تخریب با کمک ER** (ERAD)[1] به داخل سیتوزول برگردانده می‌شوند. دسته‌بندی پروتئین‌ها به مقاصد نهایی آنها، طی عبور از میان عناصر سیس، میانی و ترانس دستگاه گلژی، همراه با گلیکوزیلاسیون و آرایش پروتئولیتیک رخ می‌دهد. خانواده‌هایی از پروتئین‌های وزیکولی و گیرنده‌ای، ویژگی برای هدفمندسازی و ادغام غشایی را فراهم می‌سازند.

دسته‌بندی پروتئین‌ها در مسیر ترشحی

هدفمندسازی گلیکوپروتئین‌های اختصاصی به **لیزوزوم‌ها** بخوبی شناخته شده است. در گلژی سیس، پروتئین‌های لیزوزومی براساس یک ویژگی ساختمان سوم توسط یک گلیکوزیل-ترانسفراز مورد شناسایی قرار می‌گیرند که N-استیل گلوکزآمین فسفات (GlcNAc-P) را به

1. ER-associated degradation



شکل ۱۷-۶ هدفمندسازی پروتئین‌ها به لیزوزوم‌ها. گلیکوپروتئین کاملاً تاشده با اتصال N از غشاء شبکه ER، قبل از انتقال به دستگاه گلزی، آزاد می‌شود و گلیکوزیدازها ریشه‌های گلوکز را برداشت می‌کنند (مرحله ۱). همچنین ممکن است یک ریشه مانوز برداشت شود. مرحله ۲: در دستگاه گلزی یک گلیکوزیل ترانسفراز یک یا گاهی دو ریشه N-استیل‌گلوکزآمین فسفات را به اولیگوساکارید متصل می‌کند. مرحله ۳: یک گلیکوزیداز N-استیل‌گلوکز-آمین را برداشت نموده و یک یا دو ریشه مانوز ۶-فسفات را بر روی اولیگوساکارید باقی می‌گذارد. سپس این پروتئین توسط یک گیرنده مانوز ۶-فسفات مورد شناسایی قرار گرفته و به وزیکول‌هایی هدایت می‌شود که مقصد آنها لیزوزوم‌ها می‌باشد.

اولیگوساریدهای غنی از مانوز اضافه می‌کند. سپس یک گلیکوزیداز GlcNAc را برداشت و تولید یک اولیگوساکارید حاوی **مانوز ۶-فسفات** می‌شود (شکل ۱۷-۶) که انتقال وزیکولی این پروتئین‌ها به لیزوزوم‌ها را تعیین می‌کند. سایر زنجیرهای اولیگوساکاریدی موجود بر روی پروتئین‌ها ممکن است بیشتر پردازش شده تا تولید ساختمان‌های نوع-کمپلکس شود، ولی مانوز ۶-فسفات مقصد لیزوزومی آنها را تعیین می‌کند. مبتلایان به **بیماری سلول-I**[1] فاقد GlcNAc-P ترانسفراز هستند و نمی‌توانند آنزیم‌های لیزوزومی را

1. I-cell disease

برای مقاصد خود نشاندار کنند، در عوض این آنزیم‌ها به خارج سلول ترشح می‌شوند (ارتباط بالینی ۸-۶). کمبودهای ژنتیکی بسیاری از آنزیم‌های لیزوزومی منجر به بیماری‌هایی می‌شوند که برخی از آنها با استفاده از مزیت مکانیسم هدفمندسازی قابل تعدیل هستند (ارتباطات بالینی ۹-۶ و ۵-۱۸).

مسیر ترشحی پروتئین‌ها را به لیزوزوم‌ها، به غشاء پلاسمایی، یا برای ترشح به خارج سلول هدایت می‌کنند. پروتئین‌های ER و دستگاه گلژی با به‌کارگیری نسبی این مسیر هدفمند می‌شوند. برای مثال، قرارگیری پروتئین‌ها در هر طرف یا پل‌زدن بر روی غشاء ER می‌تواند ذره شناسایی پیام را به طرق متفاوتی مورد استفاده قرار دهد (شکل ۱۸-۶). گاهی اوقات یک توالی پیام در نزدیکی انتهای آمینو پروتئین قرار نداشته و در قسمت پایین‌تری در محل اتصال به SRP قرار دارد. یک دومن انتهای آمینو در سطح سیتوپلاسمی باقی مانده و توالی پیام و قطعه انتهای کربوکسیل به داخل و از میان ترانس‌لوکون انتقال داده می‌شوند. **توالی‌های لنگرانداز** آبگریز موجود در یک پروتئین می‌توانند طوری در داخل غشاء مدفون شوند که همچنان بیشتر توالی آن در سطح سیتوپلاسمی باقیمانده و یا در سطح مجرایی غشاء ER نگه داشته شود. توالی‌های لنگرانداز متعددی در یک پلی‌پپتید واحد می‌توانند سبب شوند تا این پلی‌پپتید چندین بار از عرض غشاء عبور کند و بنابراین قسمت اعظم آن را در داخل غشاء نگه دارد. این توالی‌های آبگریز توسط قوس‌های قطبی جدا می‌شوند که موقعیت آنها توسط ریشه‌های پهلویی با بار مثبت تعیین می‌گردد که در سمت سیتوپلاسمی غشاء غالب هستند.

ارتباط بالینی ۸-۶

بیماری‌های هدفمندسازی لیزوزومی: بیماری سلول I

بیماری سلول I (موکولیپیدوز II) از نقص‌هایی در هدفمندسازی آنزیم‌های لیزوزومی، به دلیل کمبود **GlcNAc-۱- فسفوترانسفراز**، حاصل می‌شوند که آنزیم انتقال‌دهنده N- استیل‌گلوکزآمین فسفات به اولیگوساکاریدهای نوع غنی از مانوز پروتئین‌هایی هستند که مقصد آنها لیزوزوم است. این آنزیم هگزامری شامل سه نوع زیرواحد کدشونده توسط دو ژن، GNPTAB و GNPTG، می‌باشد. فیبروبلاست‌های مربوط به افراد مبتلا اجسام انکلوزیونی متراکمی را نشان می‌دهند (به همین دلیل به آنها سلول I گفته می‌شود) و دچار کمبود فعالیت فسفوترانسفرازی هستند؛ آنزیم‌های لیزوزومی متعددی به داخل محیط ترشح شده و میزان بالای آنزیم‌های لیزوزومی در داخل پلاسما و سایر مایعات بدن بیمار وجود دارد. بیماری با عقب‌ماندگی روانی -حرکتی شدید، ناهنجاری‌های اسکلتی متعدد، اجزاء خشن صورت، و محدودیت حرکت مفصلی مشخص می‌شود. علائم معمولاً در زمان تولد وجود دارند و تا زمان مرگ، معمولاً ۸ سالگی، پیشرفت می‌کنند. تقریباً تمامی بیماران جهش‌های تغییر قالب یا خاتمه زنجیر را در ژن GNPTAB نشان می‌دهند.

پلی‌دیستروفی پسود هورلر[1] (موکولیپیدوز III) با بیماری خفیف‌تری ارتباط دارد که در آن فعالیت فسفوترانسفرازی کاهش نشان می‌دهد و کمبود آن کامل نیست. شروع بیماری معمولاً با تأخیر تا ۲ تا ۴ سالگی است، پیشرفت بیماری آهسته‌تر است، و بیماران می‌توانند تا بزرگسالی زنده بمانند. تشخیص قبل از تولد هر دو بیماری ممکن می‌باشد، ولی هنوز هیچ درمان قطعی وجود ندارد.

1. Pseudo Hurler polydystrophy

ارتباط بالینی ۹-۶

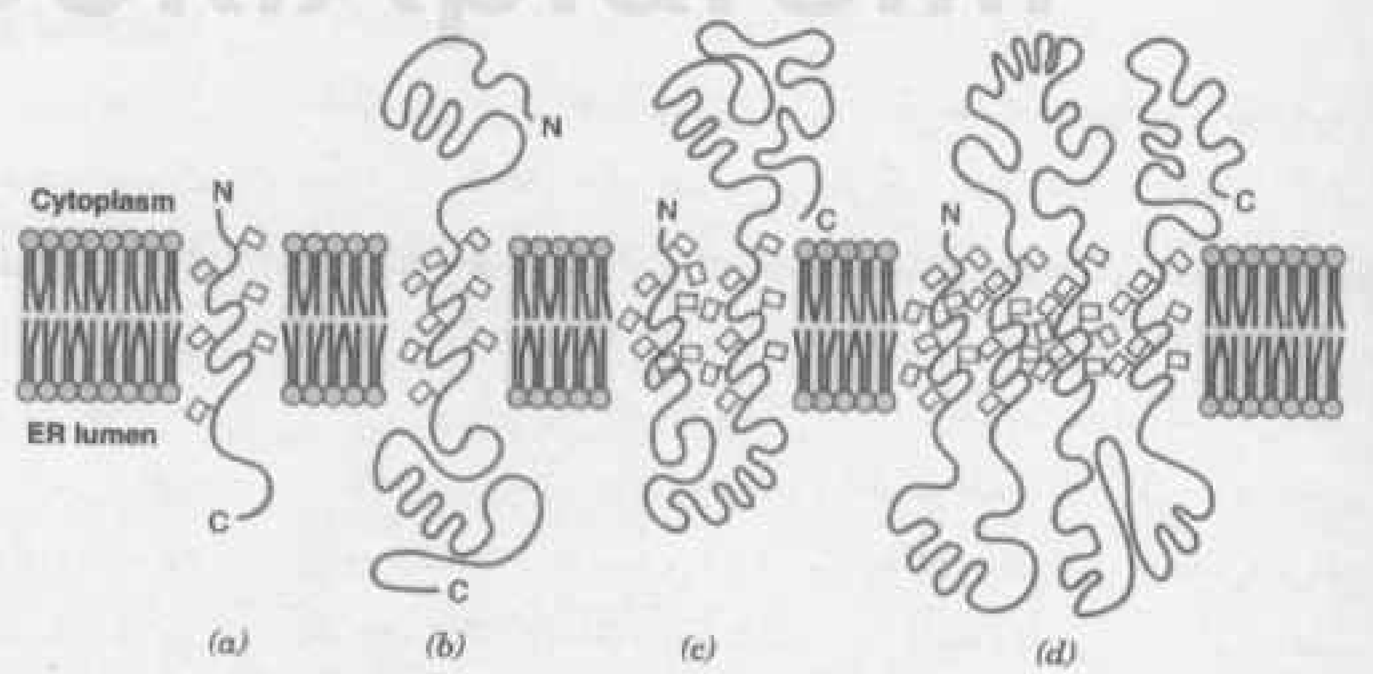
جایگزینی آنزیمی: درمان برای بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی

چندین بیماری حاصل کمبود ژنتیکی یک آنزیم هیدرولیتیک در لیزوزوم‌ها هستند (ارتباط بالینی ۵-۱۸ را ببینید)، که منجر به انباشتگی مواد تخریب‌نشده می‌شوند. تعدادی از این بیماری‌ها، اهدافی برای **درمان جایگزینی آنزیمی**[1] **(ERT)** می‌باشند که در آنها تجویز داخل‌وریدی آنزیم انسانی خالص‌شده که قابلیت برداشت لیزوزومی را دارند، می‌تواند علائم را کاهش دهد (ولی نقص زمینه‌ای را درمان نمی‌کند).

موکوپلی‌ساکاریدوز نوع I حاصل نقص‌هایی در α-L-یدورونیداز می‌باشد که یک آنزیم لیزوزومی برای تجزیه گلیکوزآمینوگلیکان‌ها است. بیش از ۷۰ جهش شناسایی شده‌اند، و علائم از عقب‌ماندگی ذهنی شدید و مرگ زودرس در کودکان (سندروم هورلر[2]) تا نقص‌های خفیف‌تر شامل کاهش شنوایی و کدورت قرنیه، ولی هوش و عمر طبیعی، متفاوت هستند. درمان جایگزینی آنزیم با استفاده از آنزیم انسانی طبیعی نوترکیبی در سال ۲۰۰۳ مورد تصدیق قرار گرفت و منجر به کاهش قابل توجه علائم شد. موکوپلی‌ساکاریدوز نوع II (کمبود یدورونات-۲-سولفاتاز) و موکوپلی‌ساکاریدوز نوع VI (سندروم ماروتئوکس-لامی[3]، کمبود N-استیل گالاکتوزآمین) نیز برای ERT مورد تأیید قرار گرفتند.

بیماری گوشه[4] حاصل کمبود یک گلوکوسربروزیداز است و سبب انباشتگی گلوکوسربروزید می‌شود. علائم در بیماری گوشه نوع شامل بزرگی کبد و طحال و مشکلات استخوانی متعدد می‌باشند؛ ERT، به‌خصوص در کودکان کم سن، در کاهش شدت بیماری موفق بوده است. بیماری پُمپ[5] اطفال حاصل کمبود α-۱،۴-گلوکوزیداز اسیدی است که منجر به انباشتگی گلیکوژن در لیزوزوم‌ها و میوپاتی قلبی-اسکلتی می‌شود. بیماری فابری[6] حاصل کمبود α-گالاکتوزیداز A می‌باشد که منجر به انباشتگی اسفنگولیپید و آسیب عضوی می‌شود که برای اولین بار در ۶ تا ۸ سالگی نمایان شده و همراه با مرگ در میانسالی است. ERT این بیماری‌ها موفقیت تقریبی را نشان داده است، ولی هزینه آنزیم‌های خالص برای تمامی این درمان‌ها بسیار بالا می‌باشد.

1. Enzyme replacement therapy
2. Hurler syndrome
3. Maroteaux-Lamy syndrome
4. Gaucher disease
5. Pompe disease
6. Fabry diease



شکل ۱۸-۶ توپولوژی پروتئین‌ها در غشاء شبکه آندوپلاسمی. پروتئین‌ها با جهت‌های مختلف نسبت به غشاء نشان داده شده‌اند. در (a) پروتئین با یک پپتید پیام شکسته‌نشده به سطح مجرایی غشاء لنگر انداخته است. در (b) توالی پیام در انتهای آمینو قرار ندارد؛ یک دومن پروتئین قبل از خروج پپتید پیام سنتز شده است. قرارگیری توالی پیام انتهایی و به‌دنبال آن تکمیل ترجمه، منجر به تولید پروتئینی با یک دومن انتهای آمینوی سیتوپلاسمی، یک قطعه مرکزی عبورکننده از غشاء، و یک دومن انتهای کربوکسیل در مجرای ER می‌شود. (c) یک پروتئین با جهت مخالف: یک توالی پیام انتهای آمینو که می‌بایست توسط پپتیداز پیام شکسته شده باشد، منجر به امتداد یک قطعه از پروتئین به‌داخل مجرای ER می‌شود. یک توالی لنگراندازی آبگریز متصل به غشاء باقی مانده و مانع ادامه عبور پروتئین از میان غشاء می‌شود که نتیجه آن شکل‌گیری یک دومن انتهای کربوسیلی سیتوپلاسمی است. در (d) چندین پیام داخلی و توالی لنگراندازی این امکان را فراهم می‌سازند تا قطعات مختلف پروتئینی در هر دو سمت غشاء قرار گیرند.

پیام‌های دسته‌بندی دیگر تعیین می‌کنند که پروتئین‌ها (به عنوان بار) به چه شکلی به زیربخش‌های گلژی، گرانول‌های ذخیره‌ای و ترشحی مختلف، و عناصر اختصاصی غشاء پلاسمایی هدایت شوند. برای مثال، پروتئین‌های محلول در پاسخ به یک توالی انتهای کربوکسیل **KDEL** (Lys-Asp-Glu-Leu) در مجرای ER حفظ می‌شوند. یک توالی متفاوت در یک انتهای کربوکسیل در معرض قرارگرفته، ابقاء در غشاء ER را علامت می‌دهد. برخی دومن‌های ترانس‌ممبران منجر به ابقاء در گلژی می‌شوند. گلیکوزیلاسیون و سولفاسیون پلی‌پپتید - اختصاصی برخی هورمون‌های گلیکوپروتئینی در هیپوفیز قدامی، دسته‌بندی آنها در گرانول‌های ذخیره‌ای را وساطت می‌کند. تغییر اسید پلی‌سیالیکی یک پروتئین چسبندگی سلول عصبی برای این پروتئین اختصاصی بوده و طی نمو تنظیم می‌شود.

انتقال پروتئین‌ها به‌داخل میتوکندری پیچیده است

میتوکندری یک مشکل اختصاصی هدفمندسازی است و نقص در این سیستم منجر به بیماری می‌شود (ارتباط بالینی ۱۰-۶). اکثر پروتئین‌های میتوکندریایی در سیتوزول و بر روی ریبوزوم‌های آزاد به‌صورت **پره‌پروتئین** سنتز می‌شوند. **پیش‌توالی‌های**[1] انتهای آمینو پروتئین را برای انتقال به میتوکندری علامتدار می‌کنند؛ این پیام هدفمندسازی برای یک توالی

ارتباط بالینی ۱۰-۶

نقص در انتقال پروتئین به‌داخل میتوکندری و بیماری‌ها

هدفمندسازی غیرمؤثر به میتوکندری‌ها می‌تواند عوارض جدی را به دنبال داشته باشد. لاکتیک اسیدمی حاصل از کمبودهایی در کمپلکس پیروات دهیدروژناز (PDH) با جهش‌هایی در چندین ژن، معمولاً زیرواحد $E1\alpha$ متصل به X، در ارتباط است. یک جهش نقطه‌ای منجر به جایگزینی Arg ← Pro در پیام هدفمندسازی میتوکندریایی می‌شود که نتیجه آن کاهش انتقال $E1\alpha$، کاهش فعالیت PDH و علائم متعدد عصبی و غیره می‌باشد. بدهدفمندسازی[1] به میتوکندری در برخی موارد هیپراگزالوری اولیه نوع رخ می‌دهد. آلانین/گلی‌اکسیلات آمینوترانسفراز به‌طور طبیعی تبدیل گلی‌اکسیلات به گلیسین را در پراکسی‌زوم‌ها کاتالیز می‌کند. جهش‌های نقطه‌ای مجزا که سبب تولید یک پیام هدفمندسازی میتوکندریایی و تغییر تاشدن و دیمریزاسیون آنزیمی می‌شوند، این آنزیم را به میتوکندری هدایت می‌کنند؛ عملکر پراکسی‌زوم را کاهش می‌دهند؛ رسوب اگزالات در کلیه، مجاری ادراری و محل‌های دیگر را افزایش می‌دهند؛ و نهایتاً نارسایی کلیوی بوجود می‌آورند. دسته‌بندی و تمرکززایی نامناسب در میتوکندری، عاملی برای برخی موارد بیماری کبدی الکلی است. سوپراکسید دیس‌موتاز منگنز (MnSOD) به‌طور طبیعی در ماتریکس میتوکندری قرار دارد. قرارگیری والین (به‌جای آلانین) در موقعیت ۱۶ توالی هدفمندسازی منجر به احتباس آنزیم در غشاء میتوکندریایی داخلی، کاهش فعالیت MnSOD و کاهش توانایی سم‌زدایی گونه‌های واکنشگر اکسیژن تولیدی با مصرف الکل می‌شوند.

نقص در پروتئین‌های مربوط به مکانیسم انتقال به داخل و دسته‌بندی نیز می‌توانند منجر به بیماری شوند. سندروم کری دیس‌تونی[2] با نقص‌هایی در یک جزء TIM، Tim 8، ارتباط داشته است (ارتباط بالینی ۶-۶ را برای علت متفاوتی برای کری مرتبط با میتوکندری ببینید). نقص‌های Tim 14 با یک کاردیومیوپاتی همراه با آتاکسی مرتبط است. کاهش میزان چاپرون Hsp60 ماتریکس میتوکندری با کاهش تعداد و مورفولوژی غیرمعمول میتوکندری‌ها و فلج اندام تحتانی اسپاسمی[3] و نارسایی چندسیستمی ارتباط دارد.

1. Mistargeting
2. Deafness dystonia syndrome
3. Spastic paraplegin

1. Presequences

اختصاصی نیست، بلکه یک مارپیچ α دوگانه‌دوست با بار مثبت می‌باشد که توسط یک گیرنده میتوکندریایی مورد شناسایی قرار می‌گیرد. این پره‌پروتئین‌ها به کمک چاپرون‌ها به میتوکندری انتقال یافته و در ابتدا توسط یک **کمپلکس ترانس‌لوکاز غشاء خارجی**[1] (TOM) از میان غشاء خارجی جابه‌جا (تانشده) می‌شود، سپس توسط یک **کمپلکس ترانس‌لوکاز غشاء داخلی**[2] (TIM) وارد ماتریکس میتوکندری (یا غشاء داخلی میتوکندری) می‌گردد؛ این واکنش‌ها وابسته به انرژی هستند. عبور در محل‌های چسبندگی انجام می‌شود که در آنها غشاءهای داخلی و خارجی در نزدیکی یکدیگر قرار دارند و چندین پروتئین بین غشایی در آن همکاری دارند. پروتئازها پیام هدفمندسازی ماتریکسی را برداشت می‌کنند، ولی ممکن است توالی‌های دیگر باقی بمانند که سبب دسته‌بندی بیشتر پروتئین در داخل میتوکندری، برگشت به غشاء داخلی (از طریق یک کمپلکس متفاوت TIM)، یا به فضاء بین‌غشایی می‌شوند.

برای مثال، در پاسخ به یک توالی آبگریز، یک پیش‌ساز کوتاه‌شده سیتوکروم b_2 از ماتریکس به غشاء داخلی برمی‌گردد؛ با ادامه پروتئولیز، این پروتئین به فضای بین‌غشایی آزاد می‌شود. برعکس، آپوپروتئین سیتوکروم c (بدون هِم) به غشاء خارجی اتصال یافته و به داخل فضای بین‌غشایی انتقال داده می‌شود. در این محل، هِم را دریافت نموده و متحمل تغییر کونفورماسیونی می‌شود که ابقاء آن را تضمین می‌کند. پروتئین‌های غشاء خارجی نیز به کمپلکس TOM هدایت می‌شوند، ولی توالی‌های لنگرانداز سبب جهت‌گیری و ابقاء آنها، یا به صورت فرورفته در غشاء یا همراه با دومن‌های کروی در سطح غشاء خارجی میتوکندری، می‌گردند.

پیام‌های هدفمندسازی، پروتئین‌ها را به اندامک‌های اختصاصی هدایت می‌کنند

پروتئین‌هایی می‌بایست به داخل هسته انتقال داده شوند که در داخل سیتوزول سنتز شده‌اند. پروتئین‌های هسته توسط پیام تمرکزایی[3] که شامل دو دسته کاملاً مجزای اسیدهای آمینه بازی یا گاهی یک توالی بازی واحد است، هدفمند می‌شوند. این پیام‌ها با پروتئین‌های حامل (برای مثال، ایمپورتین‌ها) تعامل می‌کنند که آنها را از میان **کمپلکس‌های منفذ هسته‌ای**[4] استوانه‌ای عبور می‌دهند که در عرض غشاء هسته قرار دارند. برای انتقال نیاز به GTPase Ran می‌باشد. کلاس متفاوتی از پروتئین‌های تنظیمی بین سیتوپلاسم و هسته جابه‌جا می‌شوند تا پیام‌های مربوط به فعال‌سازی رونویسی را انتقال دهند. فسفریلاسیون یک SPS (Ser-Pro-Ser) یا TPT (Thr-Pro-Thr) سبب القاء برداشت هسته‌ای می‌شود.

پراکسی‌زوم‌ها پروتئین‌های ماتریکسی خود را از سیتوزول دریافت می‌کنند و ممکن است برای رفع نیازهای سلولی نیاز به تنظیم محتوای آنزیمی خود داشته باشند. یکی از

1. Translocase of outer membrane
2. Translocase of inner membrane
3. Localization signals
4. Nuclear pore complexes

پیام‌های هدفمندسازی، تری‌پپتید انتهای کربوکسیل، **Ser-Lys-Leu (SKL)**، می‌باشد که با یک انتقال‌دهنده اتصالی - بار جهت انتقال به غشاء پراکسی‌زوم برای لنگراندازی، جابه‌جایی یا آزادسازی به داخل ماتریکس، تعامل می‌کند. یک پیام هدفمندسازی نوناپپتیدی انتهای آمینو نیز با استفاده از یک کمپلکس انتقال‌دهنده متفاوت عمل می‌کند. برخی پروتئین‌های غشاء پراکسی‌زومی در سیتوپلاسم سنتز می‌شوند و توسط پیام‌های هدفمندسازی داخلی در غشاء متمرکز می‌گردند. کلاس دومی از پروتئین‌ها در ER سنتز شده و به غشاء پراکسی‌زومی انتقال داده می‌شوند.

برخی پروتئین‌ها در بیش از یک بخش تحت‌سلولی باقی می‌مانند. یک پیام تمرکز کمتر از حد مطلوب می‌تواند منجر به هدفمندسازی غیرمؤثر و یک موقعیت دوگانه، همانند ترشح نسبی یک مهارکننده فعال‌کننده پلاسمینوژن، شود. یک پروتئین می‌تواند دو پیام هدفمندسازی داشته باشد که سبب تمرکز دوگانه می‌شود. دوتاشدگی و واگرایی ژنی می‌تواند منجر به پیام‌های هدفمندسازی متفاوت در پلی‌پپتیدهای بالغی شود که ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند. جایگاه‌های شروع متفاوت رونویسی یا اسپلایسینگ متفاوت pre-mRNA می‌تواند منجر به تولید پیام‌های مختلفی از یک ژن واحد گردد. ملکول‌های mRNA پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/کالمودولین که به شکل متفاوتی اسپلایس شده‌اند، از نظر وجود یک قطعه داخلی کدکننده یک پیام تمرکز در هسته، با یکدیگر اختلاف دارند. بدون این قطعه، پروتئین مذکور در داخل سیتوزول باقی می‌ماند.

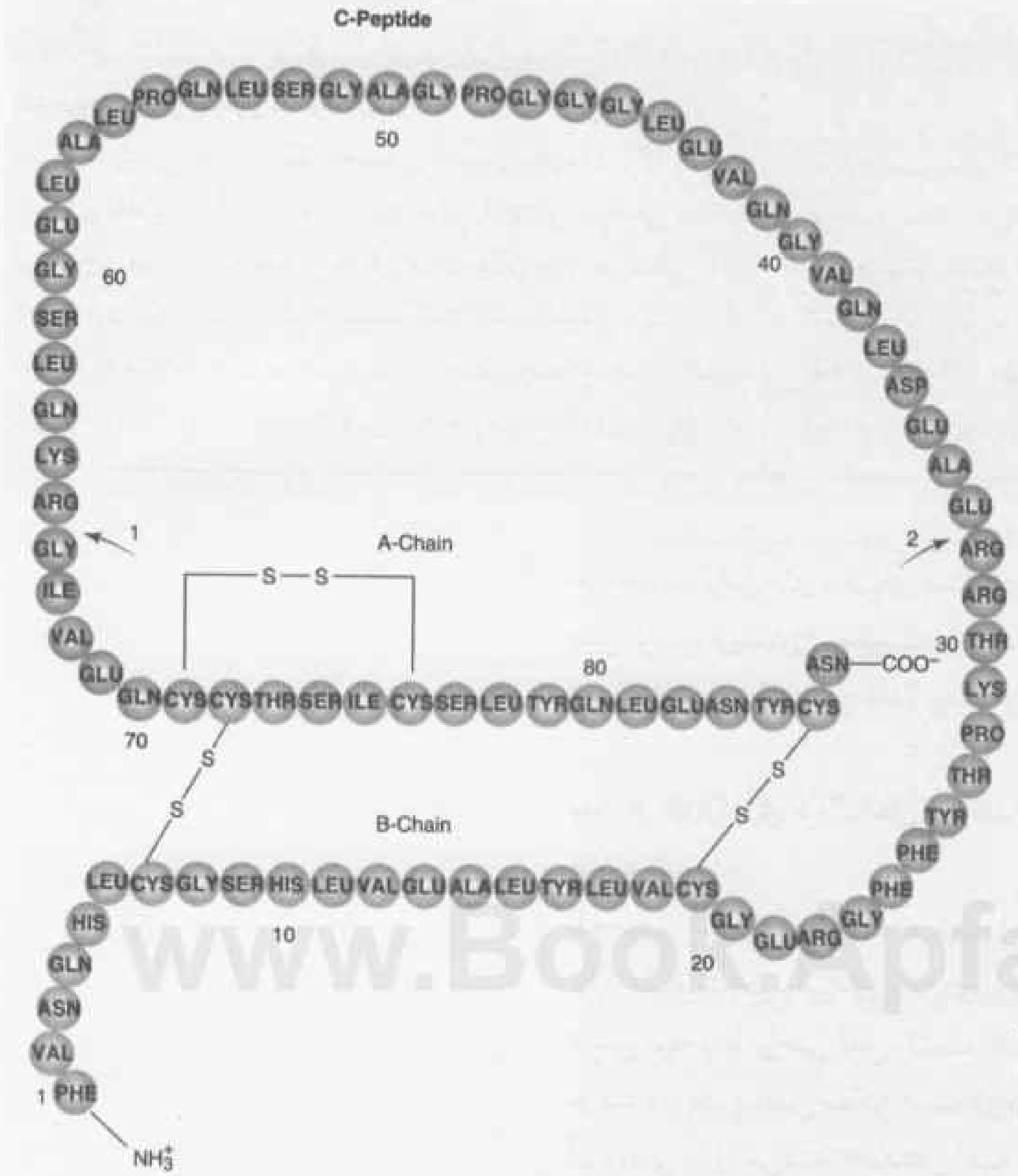
بالاخره، گاهی از اولین کدون شروع یک mRNA صرفنظر می‌شود. **شروع ترجمه متفاوت** منجر به تولید دو شکل فوماراز کبدی در موش صحرایی می‌شود؛ یکی حاوی یک توالی هدفمندسازی میتوکندریایی است، در حالی که دیگری فاقد آن بوده و در داخل سیتوزول باقی می‌ماند.

۶-۶ • تغییرات دیگر بعد از ترجمه

طی حوادث دیگر بلوغ، پروتئین‌ها می‌توانند تغییر یافته و اشکال وظیفه‌دار نهایی خود را به‌دست آورند. برخی از این حوادث بسیار معمول هستند، در حالی‌که بقیه محدودیت زیادی دارند. بسیاری از تغییرات قابل‌برگشت منجر به تنظیم فعالیت پروتئین می‌شوند.

پروتئولیز نسبی سبب آزادسازی انسولین و فعال‌سازی زیموژن‌ها می‌شود

پروتئولیز نسبی یک مرحله بلوغ معمول است. توالی‌ها را می‌توان از هر دو انتها یا از داخل پروتئین برداشت نمود. پروتئولیز در ER و دستگاه گلژی به بلوغ هورمون پروتئینی انسولین کمک می‌کند (شکل ۱۹-۶). پره‌پروانسولینی کدشونده توسط mRNA، در داخل مجرای ER قرار داده می‌شود. پپتیداز پیام پپتید پیام را شکسته تا تولید پروانسولین شود که تاشده و اتصالات دی‌سولفیدی صحیح را به‌وجود می‌آورد. پروانسولین به دستگاه گلژی انتقال



شکل ۱۹-۶ **بلوغ پروانسولین انسانی.** بعد از شکسته‌شدن دو جایگاهی که با پیکان نشان داده شده‌اند، ریشه‌های آرژنین ۳۱، ۳۲ و ۶۵ و ریشه لیزین ۶۴ برداشت شده تا تولید انسولین و پپتیدC گردد.

داده شده و در آنجا در داخل گرانول‌های ترشحی ذخیره می‌شود. یک **پپتید متصل‌کننده**[1] (**پپتید C**) به‌طریق پروتئولیز برداشت شده و انسولین بالغ ترشح می‌شود. در هیپرپروانسولینمی خانوادگی، این پردازش ناقص انجام می‌شود (ارتباط بالینی ۱۱-۶). مسیر بیوسنتز انسولین تولید مقادیر برابر زنجیرهای A و B را تضمین می‌کند، به‌علاوه، پروانسولین به کونفورماسیونی تا می‌شود که در آن ریشه‌های سیستئین برای تولید پیوند دی‌سولفیدی در موقعیت مناسب قرار گرفته‌اند. پروانسولین احیاءشده و دناتوره‌شده می‌تواند دوباره به شکل صحیحی تا شود، در صورتی که رناتوراسیون انسولین احیاءشده دناتوره، غیرمؤثر بوده و منجر به ایجاد اتصالات دی‌سولفیدی غلط می‌شود.

شکستن پروتئین‌های پیش‌ساز، یک راه معمول فعال‌سازی آنزیمی است. پروتئازهای گوارشی نمونه‌های کلاسیک این نوع فعال‌سازی هستند (ص ۱۳۶۹). پیش‌سازهای زیموژنی

1. Connecting peptide

ارتباط بالینی ۱۱-۶

هیپرپروانسولینمی خانوادگی

هیپرپروانسولینمی خانوادگی یک ناهنجاری اتوزومال غالب است که همراه با آزادسازی مقادیر تقریباً برابر انسولین و پروانسولین با پردازش غیرطبیعی به‌داخل گردش خون می‌باشد. با وجود این که افراد مبتلا غلظت بالای پروانسولین را در گردش خون خود دارند، از نظر متابولیسم گلوکز واضحاً طبیعی هستند که نه دیابتی و نه هیپوگلیسمیک نمی‌شوند. در ابتدا معتقد بودند که نقص در کمبود یکی از سه پروتازی است که پروانسولین را پردازش می‌کنند: آندوپپتیدازهایی که پیوندهای پپتیدی Arg31-Arg32 و Lys64-Arg65 را می‌شکنند و یک کربوکسی‌پپتیداز. در چندین خانواده، این نقص در جایگزینی Arg 65 با His یا Leu می‌باشد که مانع تجزیه پیوند بین پپتید C و زنجیر A انسولین و در نتیجه ترشح پروانسولینی با پردازش نسبی می‌شود. در یک خانواده، یک جهش نقطه‌ای (His10 ← Asp10) منجر به هیپرپروانسولینمی می‌شود، ولی مشخص نیست که این جهش به چه شکلی منجر به‌تداخل در پردازش می‌گردد.

غیرفعال در گرانول‌های ذخیره‌ای بسته‌بندی شده و بعد از ترشح، با پروتئولیز فعال می‌شوند. بدین ترتیب، **تریپسینوژن** به **تریپسین** و یک هگزاپپتید انتهای آمینو شکسته می‌شود، و **کیموتریپسینوژن** به **کیموتریپسین** و دو پپتید می‌شکنند (ص ۱۳۸۶).

بعد از قرارگیری در داخل پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه می‌توانند تغییر داده شوند

با وجود این که ۲۰ اسید آمینه به طریق ژنتیکی کد می‌شوند، **تغییرات بعد از ترجمه** امکان تولید مشتقات اسید آمینه‌ای متعددی را در پروتئین‌ها فراهم می‌سازند. تغییر ممکن است دائمی بوده و یا براحتی قابل‌برگشت باشد. در حالی‌که تعداد اسیدهای آمینه تغییریافته موجود در یک پروتئین ممکن است کوچک باشد، اغلب آنها نقش مهمی را در عملکرد آن پروتئین بازی می‌کنند. اسیدهای آمینه تغییریافته موجود در پروتئین‌ها در جدول ۱۱-۶ فهرست شده‌اند. مثال‌های مهم عبارتند از:

- تغییر انتهای آمینو: سنتز پروتئین با استفاده از متیونین شروع می‌شود، ولی با پروتئولیز اغلب یک یا چند ریشه انتهای آمینو برداشت می‌شود. سپس در اغلب موارد، این انتهای آمینوی جدید، مثلاً با استیلاسیون، تغییر داده می‌شود، زیرواحدهای α پروتئین‌های G هدایت‌کننده پیام (ص ۷۱۱) با اسید میریستیک یا پالمیتیک تغییر داده می‌شوند. گلوتامین انتهای آمینو معمولاً به‌طور خود به‌خوی حلقوی شده و تولید یک ریشه پیروگلوتامیل می‌کند. انتهای آمینو همچنین می‌تواند با اضافه‌شده یک اسید آمینه، بلندتر شود (قسمت ۸-۶ مربوط به تخریب پروتئین را ببینید).
- تولید پیوند دی‌سولفیدی بین‌زنجیری و داخل‌زنجیری: تولید پیوند دی‌سولفیدی که توسط دی‌سولفید ایزومراز کاتالیز می‌شود، می‌تواند مانع بازشدن پروتئین و بنابراین عبور از عرض غشاء شود، لذا راهی برای متمرکزسازی می‌باشد. همانند حالت مربوط به انسولین، پیوندهای دی‌سولفیدی می‌توانند به‌طریق کووالان پلی‌پپتیدهای مجزا را به یکدیگر متصل کنند و برای عملکرد آنها ضروری هستند.

جدول ۱۱-۶ • اسیدهای آمینه تغییریافته موجود در پروتئین‌ها[۱]

آمینو اسید	تغییرات یافت‌شده
انتهای آمینو	فورمیلاسیون، استیلاسیون، آمینوآسیلاسیون، میریستیلاسیون، گلیکوزیلاسیون
انتهای کربوکسیل	متیلاسیون، ADP- ریبوزیلاسیون، تولید لنگر گلیکوزیل - فسفاتیدیل اینوزیتول
آرژنین	N- متیلاسیون، ADP- ریبوزیلاسیون
آسپاراژین	N-گلیکوزیلاسیون، N- متیلاسیون، دآمیداسیون
اسید آسپارتیک	متیلاسیون، فسفریلاسیون، هیدروکسیلاسیون، ایزومریزاسیون (iso Asp)
سیستئین	تولید سیستین، پالمیتیلاسیون، اتصال هِمی، S-گلیکوزیلاسیون، پرنیلاسیون، ADP-ریبوزیلاسیون، S-هیدروکسیلاسیون
اسید گلوتامیک	متیلاسیون، γ- کربوکسیلاسیون، ADP- ریبوزیلاسیون، پلی‌گلیسیناسیون، پلی‌گلوتامیلاسیون
گلوتامین	تولید پیروگلوتامات، دآمیداسیون، ایجاداتصال عرضی
هیستیدین	متیلاسیون، فسفریلاسیون، تولید دیفتامید، ADP- ریبوزیلاسیون
لیزین	N- استیلاسیون، N- متیلاسیون، هیدروکسیلاسیون، اکسیداسیون، اوبی‌کوئیتینیلاسیون، بیوتینیلاسیون، تولید آلیزین، ایجاد اتصال عرضی
متیونین	تولید سولفوکسید
فنیل آلانین	β - هیدروکسیلاسیون، گلیکوزیلاسیون
پرولین	هیدروکسیلاسیون، گلیکوزیلاسیون
سرین	فسفریلاسیون، گلیکوزیلاسیون، استیلاسیون، تولید α- فرمیل گلیسین، فسفوپانتتئینیلاسیون
ترئونین	فسفریلاسیون، گلیکوزیلاسیون، متیلاسیون
تریپتوفان	β- هیدروکسیلاسیون، تولید دیون، C- مانوزیلاسیون
تیروزین	فسفریلاسیون، یُدیناسیون، آدنیلاسیون، سولفوناسیون، هیدروکسیلاسیون، نیتراسیون

[۱] این فهرست جامع نیست و برخی تغییرات نادر هستند. توجه داشته باشید که هیچ تغییری بر روی گلیسین، آلانین، لوسین، ایزولوسین و والین گزارش نشده است.

- تغییر سیستئین: S- پالمیتیلاسیون به تعامل با غشاء و تردد برخی پروتئین‌ها کمک می‌کند. زیرواحدهای γ پروتئین‌های G هتروتریمری (ص ۷۱۱) با ایجاد اتصال تیواستری بین یک ایزوپرونوئید و یک سیستئین در یا نزدیک انتهای کربوکسیل، تغییر داده می‌شوند. کمبود سولفاتاز متعدد[۱] حاصل کاهش توانایی در انجام یک تغییر بعد از ترجمه سیستئین می‌باشد (ارتباط بالینی ۱۲-۶).
- تغییر لیزین: استیلاسیون و متیلاسیون گروه‌های ε-آمینوی لیزین در هیستون‌ها سبب تعدیل تعامل آنها با DNA می‌شود. بخشی از هیستون H2A نیز از طریق

1. Multiple sulfatase deficiency

ارتباط بالینی ۱۲-۶

عدم انجام تغییر بعد از ترجمه: کمبود سولفاتازی متعدد[1]

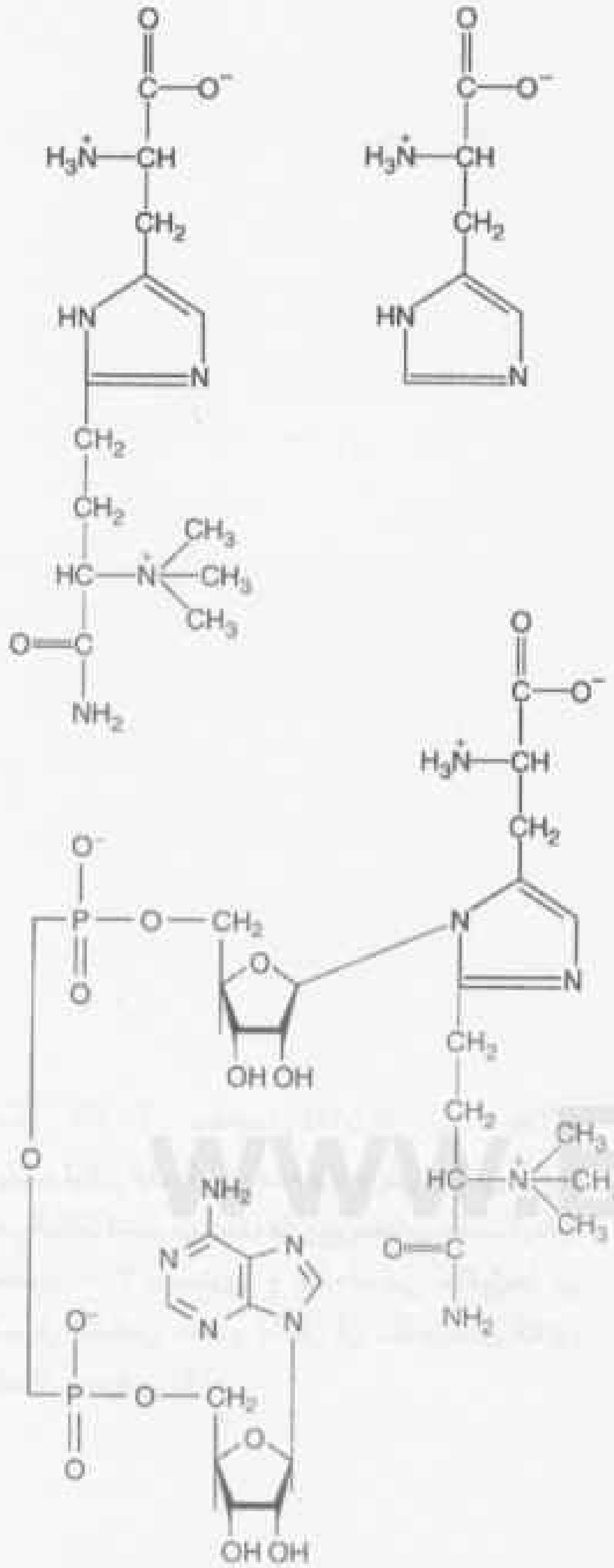
کمبود سولفاتازی متعدد یک ناهنجاری ذخیره‌ای لیزوزومی نادر است. افراد مبتلا نمو آهسته‌ای دارند و از سال دوم زندگی خود توانایی ایستادن، نشستن و صحبت کردن را از دست می‌دهند؛ قبل از مرگ در سن ۱۰ سالگی، تغییر شکل‌های فیزیکی و کمبودهای عصبی نمایان می‌شوند. کمبود شدید تمامی انواع سولفاتازها وجود دارد. تخریب ملکول‌های سولفاته بستگی به فعالیت چند سولفاتاز مرتبط دارد که اکثراً لیزوزومی هستند. کمبود سولفاتازهای مجزا نیز مورد شناسایی قرار گرفته‌اند و چندین بیماری مجزا با نقص‌های آنزیمی واحد مرتبط هستند.

کمبود سولفاتاز متعدد حاصل نقصی در تغییر بعد از ترجمه‌ای است که برای تمامی آنزیم‌های سولفاتاز مشترک است. در هر مورد، یک ریشه سیستئین آنزیم به‌طور طبیعی به C_{α}-فرمیل‌گلیسین تبدیل می‌شود. فیبروبلاست‌های افراد مبتلا به کمبود سولفاتازی متعدد، این تغییر را با کارایی به مراتب کمتری انجام می‌دهند و سولفاتازهای تغییرنیافته فاقد فعالیت کاتالیتیک هستند.

بسیاری از ملکول‌های بیولوژیکی، برای مثال گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، استروئیدها و گلیکولیپیدها، سولفاته هستند. سولفاسیون ضعیف نیز منجر به بیماری می‌شود. برای مثال، سولفاسیون غیرمؤثر گلیکوزآمینوگلیکان‌های کندروایتین سولفات و کراتان سولفات (ص ۸۹۸) غضروف منجر به تغییر شکل‌های اسکلتی جدی می‌شوند.

1. Multiple sulfatase deficiency

- اتصال ایزوپپتیدی یک گروه ε-آمینوی لیزین به گلیسین انتهای کربوکسیل اوبی‌کوئیتین، پروتئین کوچکی که فعالیت‌های تنظیمی زیادی دارد، تغییر داده می‌شود. بیوتین نیز از طریق ایجاد اتصالات آمیدی با لیزین، به چند کربوکسیلاز اتصال می‌یابد (ص ۱۰۴۲).
- گروه‌های هیدروکسیل سرین و ترئونین: علاوه بر گلیکوزیلاسیون، فسفریلاسیون قابل‌برگشت توسط پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها بسیار متداول است و از نظر عملکرد مهم می‌باشد. یکی از مثال‌های کلاسیک، فسفریلاسیون یک ریشه سرین گلیکوژن فسفریلاز توسط فسفریلاز کیناز می‌باشد (ص ۸۶۲). ریشه‌های تیروزین توسط تیروزین کینازهای بسیار اختصاصی فسفریله می‌شوند. فعالیت کینازی یکی از خصوصیات مربوط به گیرنده‌های فاکتور رشد متعدد است که در آنها اتصال فاکتور رشد سبب تحریک تقسیم سلولی می‌شود. اونکوژن‌ها که مسئول قسمتی از ترانسفورماسیون و تکثیر سلولی در سلول‌های سرطانی هستند، اغلب فعالیت تیروزین کینازی دارند و شباهت زیادی با گیرنده‌های فاکتور رشد طبیعی نشان می‌دهند. ده‌ها مثال دیگر وجود دارد؛ پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها با یکدیگر فعالیت بسیاری از پروتئین‌هایی را کنترل می‌کنند که نقش مرکزی در نمو سلولی طبیعی و غیرطبیعی دارند.
- ADP-ریبوزیلاسیون: **سم دیفتری** با ADP-ریبوزیلاسیون سبب تغییر **دیفتامید**، یک ریشه تغییریافته هیستیدین، در EF2 می‌شود (شکل ۲۰-۶). فعالیت EF2 و بنابراین سنتز پروتئین مهار می‌شود. ADP-ریبوزیلاسیون فیزیولوژیک که به واسطه سموم باکتریایی انجام نمی‌شوند، معمولاً مستلزم تغییر قابل‌برگشت ریشه‌های آرژنین و سیستئین می‌باشد و برای پیام‌رسانی سلول و همچنین پروتئین‌های تنظیمی و سطحی مهم است.



شکل ۲۰-۶ دیفتامید (بالا چپ) حاصل یک تغییر بعد از ترجمه یک ریشه اختصاصی هیستیدین (بالا چپ) در EF2 می‌باشد. در پایین، ADP- ریبوزیل -دیفتامید نشان داده شده است.

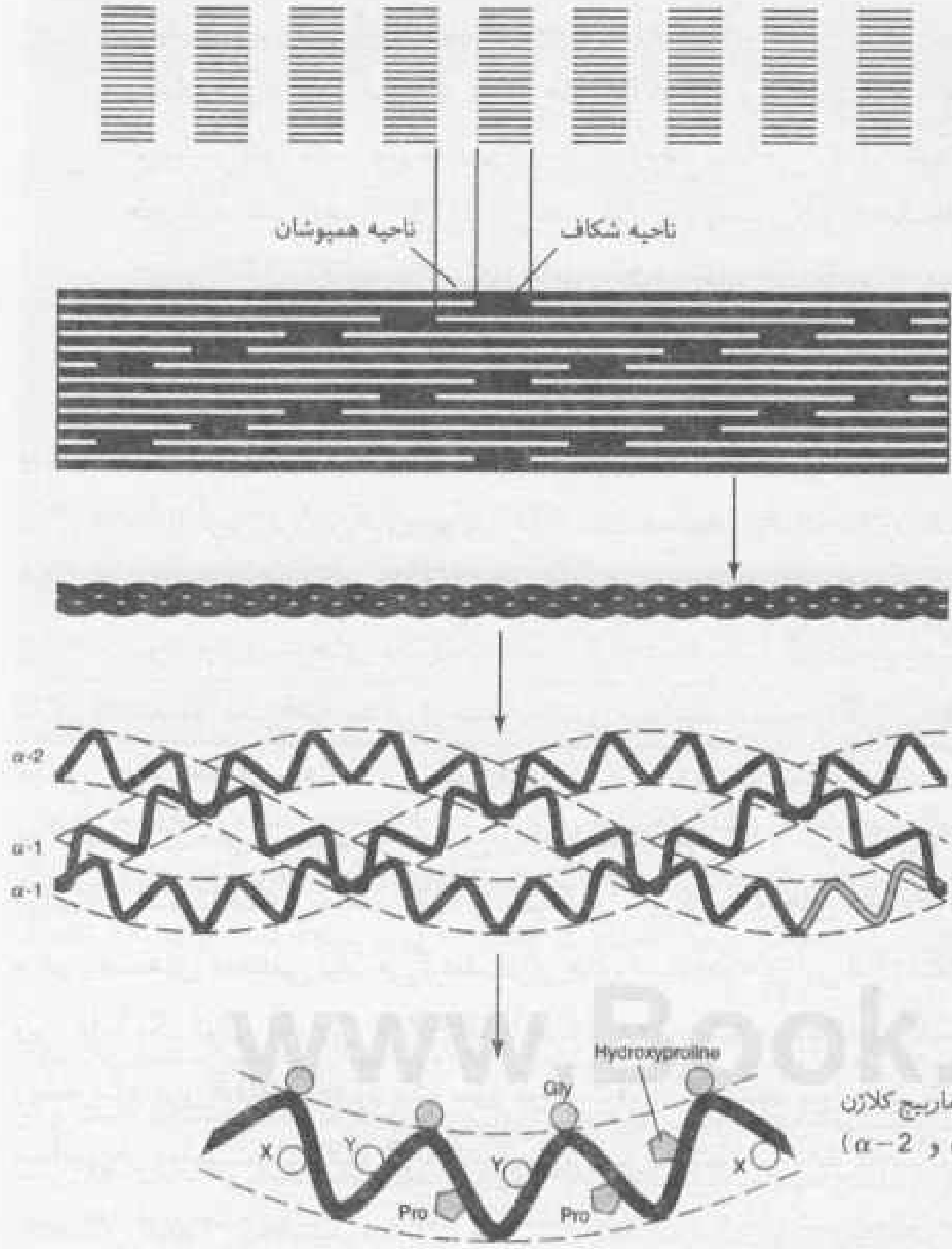
- تولید γ ـ **کربوکسی‌گلوتامات**: ریشه‌های اسید گلوتامیک موجود در چندین پروتئین انعقاد خون، پروترومبین و فاکتورهای VII، IX و X، تغییریافته هستند. γ- کربوکسی‌گلوتامات یون کلسیم را شلات (برداشت) می‌کند که خود برای انعقاد خون لازم است (ص ۱۳۱۳). این تغییر نیاز به ویتامین K دارد. مشتقات کومارین (ص ۱۳۲۶) که آنتاگونیست ویتامین K هستند، این تغییر را مهار می‌کنند. مشتقات کومارین ضدانعقادهای دارای کاربرد درمانی هستند.

بیوسنتز کلاژن نیاز به تغییرات بعد از ترجمه متعددی دارد

کلاژن‌ها فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در انسان هستند. خانواده کلاژن شامل حداقل ۲۸ گونه مختلف پروتئین‌های اکثراً رشته‌ای هستند که شبکه ساختمانی بافت‌ها و اعضاء را فراهم نموده و پروتئین‌های کلاژن- مانند دیگر خصوصیات ساختمانی مشترک دارند. کلاژن‌ها متحمل تغییرات بعد از ترجمه متعددی می‌شوند که پیچیدگی این فرایندها، اثر آنها بر روی ساختمان و عملکرد و نقص‌های تغییراتی منتهی به بیماری‌های جدی را تشریح می‌کنند. کلاژن‌های مختلف که به صورت انواع I، II، III، IV و غیره نشان داده می‌شوند (برای جزئیات ساختمانی صفحه ۱۴۲ را ببینید)، بر روی کروموزوم‌های متعددی کد می‌شوند و در بافت‌های مختلفی بیان می‌گردند. توالی‌های اسید آمینه‌ای این انواع متفاوت است، ولی غالباً یک توالی تکراری Gly-X-Y با حدود ۱۰۰ ریشه وجود دارد. گلیسین در هر ریشه سوم قرار گرفته و حدود یک سوم موقعیت‌های X توسط پرولین پر شده و تعداد مشابهی از موقعیت‌های Y را ۴- هیدروکسی‌پرولین تشکیل می‌دهد که شکل حاصل از تغییر بعد از ترجمه پرولین می‌باشد. ریشه‌های پرولین و هیدروکسی‌پرولین سبب ایجاد سختی در ساختمان مارپیچی نوع II پلی‌پرولینی خود می‌شوند (شکل ۲۱-۶). هر پلی‌پپتید کلاژن را یک زنجیر α گویند؛ یک ملکول کلاژن سه زنجیر درهم بافته را به شکل مارپیچ سه‌تایی کلاژن دارد که در آن ریشه‌های گلیسین مرکز این ساختمان را اشغال می‌کنند (ص ۱۴۲).

تولید پروکلاژن در شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی

سنتز زنجیر α کلاژن در سیتوزول آغاز می‌گردد. توالی‌های پیام انتهای آمینو به ذرات شناسایی پیام اتصال یافته و اشکال پیش‌ساز، برای مثال پره‌پرو α ۱ (I)، به داخل مجرای ER امتداد می‌یابند. هیدروکسیلاسیون اختصاصی - بافت ریشه‌های پرولین و لیزین همزمان با ترجمه و قبل از همایش یک مارپیچ سه‌تایی انجام می‌شود. پرولیل ۴-هیدروکسیلاز نیاز به توالی X-Pro-Gly- دارد (لذا ۴- هیدروکسی‌پرولین تنها در موقعیت Y توالی -Gly-X-Y- یافت می‌شود). پرولیل ۳-هیدروکسیلاز تعداد کمتری از ریشه‌های پرولین را تغییر می‌دهد و لیزیل هیدروکسیلاز برخی ریشه‌های موقعیت Y را تغییر می‌دهد. این هیدروکسیلازها نیاز به



شکل ۲۱-۶ ساختمان کلاژن (از پایین به بالا) که ترتیب توالی اول را در یک مارپیچ پلی‌پرولینی نوع III چپ‌گردان نشان می‌دهد؛ مارپیچ سه‌تایی راست‌گردان؛ ملکول ۳۰۰ نانومتری؛ و سازماندهی ملکول‌ها در فیبریل شاخص که در داخل آن ملکول‌های کلاژن اتصالات عرضی دارند.

Fe^{2+} و اسید آسکوربیک (ویتامین C) دارند. هیدروکسیلاسیون پرولین سبب تثبیت کلاژن می‌شود، در حالی که هیدروکسیلاسیون لیزین محل‌هایی را برای ایجاد اتصالات عرضی بین‌زنجیری و برای گلیکوزیلاسیون توسط گلیکوزیل ترانسفرازهای اختصاصی ER فراهم می‌کنند. وسعت تغییرات بستگی به نوع زنجیر α اختصاصی و سلولی حاوی آن دارد.

همایش سه-مارپیچی به‌واسطه چاپرون بعد از تکمیل زنجیرهای پلی‌پپتیدی و شکسته‌شدن پپتیدهای پیام رخ می‌دهد. دومن‌های پره‌پروتئین کروی انتهای کربوکسیل تا شده و بین آنها پیوندهای دی‌سولفیدی تشکیل می‌شود. این تغییر منجر به آغاز تاشدن مارپیچ سه‌تایی از انتهای کربوکسیل به انتهای آمینو می‌شود. مارپیچ سه‌تایی تکمیل‌شده با دومن‌های پره‌پروتئینی کروی در هر دو انتها، به دستگاه گلژی رفته و در آنجا اولیگوساکاریدها پردازش و بالغ می‌شوند. برخی ریشه‌های تیروزین با سولفاسیون تغییر داده شده و برخی ریشه‌های سرین فسفریله می‌شوند. سپس پروکلاژن کامل‌شده از طریق وزیکول‌های ترشحی از سلول آزاد می‌گردد.

بلوغ کلاژنی

تبدیل پروکلاژن به کلاژن در خارج سلول رخ می دهد. در کلاژن‌های تولیدکننده فیبریل (برای مثال، نوع I)، پروپپتیدهای انتهای آمینو و کربوکسیل توسط پروتئازهای مجزا شکسته می‌شوند، در حالی‌که پروپپتیدهای انتهای کربوکسیل در کلاژن‌های تولیدکننده شبکه (برای مثال، نوع IV) باقی می‌مانند. به‌طور همزمان، مارپیچ‌های سه‌تایی از طریق ایجاد تجمعات انتها به انتها و پهلو به پهلو، به صورت فیبریل هایی همایش می‌یابند، و کلاژن با ایجاد اتصالات عرضی وسیع، پایدار می‌گردد. **لیزیل اکسیداز** برخی ریشه‌های لیزین و هیدروکسی‌لیزین را به آلدئیدهای واکنشگر، آلیزین یا هیدروکسی‌آلیزین، تبدیل می‌کند. این ریشه‌ها با یکدیگر ترکیب شده تا ایجاد باز شیف و اتصالات عرضی آلدول گردد. ریشه‌های دیگری تظیر هیستیدین نیز می‌توانند متحمل واکنش‌هایی شوند که سه زنجیر α را به یکدیگر متصل می‌کنند، هرچند این واکنش‌ها بخوبی مشخص نشده‌اند. نقص‌های شناخته‌شده‌ای در بسیاری از این مراحل وجود دارند که برخی از شناخته‌شده‌ترین آنها در جدول ۱۲-۶ فهرست و در ارتباط بالینی ۱۳-۶ شرح داده شده‌اند.

۷-۶ • تنظیم ترجمه

میزان پروتئین موجود در سلول‌ها در سطوح رونویسی، ترجمه و تجزیه تنظیم می‌شود. تنظیم ترجمه می‌تواند کلی بوده و اثر کلی بر روی سنتز پروتئین داشته باشد و یا این که به شکل

جدول ۱۲-۶ • ناهنجاری‌های انتخابی در بیوسنتز و ساختمان کلاژن

ناهنجاری	نقص کلاژن	تظاهرات بالینی
استئوژنز ایمپرفکتا۱	نقص کلاژن	شکستگی استخوان‌های بلند قبل از شروع بلوغ
استئوژنز ایمپرفکتا۲	جهش‌های نقطه‌ای و نوآرایی‌های اگزونی در نواحی مارپیچ سه‌تایی	مرگ قبل از تولد، استخوان‌های بدشکل، نرم و شکننده
اهلرز-دانلوس IV	ترشح ضعیف، تخریب زودرس نوع III	پوست نیمه‌شفاف، کبودی ساده، پارگی شریان و کولون
اهلرز-دانلوس VI	کاهش هیدروکسی‌لیزین در انواع I و II	انعطاف‌پذیری بالا پوست، تحرک بالای مفصل
اهلرز-دانلوس VII	تجمع پروکلاژن نوع I؛ جدانشدن انتهای آمینو	تحرک بالا و دررفتگی مفصل
کوتیس لاکسا (سندروم اکسی‌پیتال شاخی)	کاهش هیدروکسی‌لیزین ناشی از توزیع ضعیف مس	پوست نرم، شل؛ تولید شاخ اوسی‌پیتال در نوجوانی
اسکوربوت	کاهش هیدروکسی‌پرولین به‌دلیل کمبود اسید آسکوربیک	رشد استخوانی ضعیف، بهبود ضعیف ضخم، کبودی جدی

ارتباط بالینی ۱۳-۶

نقص‌های سنتز کلاژن

استئوژنز ایمپرفکتا (OMIM ۱۶۶۲۱۰)

استئوژنز ایمپرفکتا[1] گروهی از حداقل هفت ناهنجاری است که از نظر بالینی، ژنتیکی یا بیوشیمیایی قابل تمایز هستند و با شکنندگی استخوان، تغییر شکل‌های استخوانی، و توده استخوانی پایین مشخص می‌شود. چندین واریانت از جهش‌هایی حاصل می‌شوند که زنجیرهای $\alpha(I)$ تغییر یافته را تولید می‌کنند و تأثیر آن بر روی شدت علائم تنوع وسیعی دارد. در واضح‌ترین مثال، یک جهش حذفی منجر به حذف ۸۴ اسید آمینه در زنجیر $\alpha1(I)$ می‌شود. زنجیرهای کوتاه‌شده $\alpha1(I)$ به زنجیرهای طبیعی $\alpha1(I)$ و $\alpha2(I)$ پیوسته و مانع تولید مارپیچ سه‌تایی طبیعی کلاژن و در نتیجه سبب تخریب تمامی زنجیرها می‌شود. سه‌چهارم تمامی ملکول‌های کلاژن تولیدی، حداقل یک $\alpha1(I)$ ناقص دارند. اشکال دیگر استئوژنز ایمپرفکتا حاصل جهش‌های نقطه‌ای هستند که اسید آمینه دیگری را جایگزین گلیسین می‌کنند. از آنجایی که گلیسین می‌بایست در داخل مارپیچ سه‌رشته کلاژن قرار گیرد، این نوع جایگزینی‌ها سبب ناپایداری مارپیچ می‌شود.

سندروم اهلرز- دانلوس، نوع IV (OMIM ۱۳۰۰۵۰)

سندروم اهلرز-دانلوس[2] گروهی از حداقل ۱۰ ناهنجاری است که از نظر بالینی، ژنتیکی، و بیوشیمیایی قابل تمایز هستند، ولی از نظر تظاهرات مربوط به ضعف ساختمانی در بافت همبند اشتراک دارند. مشکلات معمول همراه با شکنندگی، افزایش امتدادپذیری پوست، و تحرک بیشتر مفاصل می‌باشند. سندروم اهلرز- دانلوس نوع IV حاصل نقص‌هایی در کلاژن نوع III می‌باشد (ص.۱۴۲) که به‌خصوص در پوست، شریان‌ها و اعضاء توخالی مهم است. مشخصات شامل پوست نازک نیمه‌شفاف که به راحتی می‌توان از میان آن وریدها را دید، خونمردگی قابل‌توجه، و گاهی ظاهر پیر در دست‌ها و پوست، می‌باشند. مشکلات بالینی در نتیجه پارگی شریانی، سوراخ‌شدن روده و پارگی رحم در هنگام بارداری یا زایمان، نمایان می‌شوند. به‌دلیل شکنندگی بافت، ترمیم جراحی مشکل است. نقص در اهلرز- دانلوس نوع IV حاصل تغییراتی در ساختمان زنجیرهای نوع III، به‌دلیل جهش‌های نقطه‌ای که سبب جایگزینی گلیسین و اختلال در مارپیچ سه‌تایی کلاژن می‌شوند، و برداشت اگزون که پلی‌پپتید را کوتاه می‌کند و می‌تواند منجر به ترشح غیرمؤثر، کاهش پایداری کلاژن و تولید غیرطبیعی فیبریل‌های کلاژن نوع III شوند، می‌باشد. در برخی موارد، کلاژن نوع III در ER خشن انباشته شده و با سرعت بسیار پایینی تجزیه می‌شود.

کمبود لیزیل هیدروکسیلاز (OMIM۲۲۵۴۰۰)

در سندروم اهلرز- دانلوس نوع VI، کمبود لیزیل هیدروکسیلاز وجود دارد. حداقل ۲۰ جهش متفاوت شناخته‌شده وجود دارند که منجر به کاهش محتوای هیدروکسی‌پرولین کلاژن‌های نوع I و III (ص.۱۴۲) و در نتیجه ایجاد اتصالات عرضی با پایداری کمتر در فیبریل‌های کلاژن می‌شوند. مقداری اتصالات عرضی بین لیزین و آلیزین به‌وجود می‌آید، ولی اینها پایدار نیستند و به راحتی اتصالات عرضی حاوی هیدروکسی‌لیزین، بالغ نمی‌شوند. هیدروکسی لیزین همچنین محلی برای گلیکوزیلاسیون است، ولی عملکرد این تغییر نامشخص می‌باشد. خصوصیات بالینی شامل افزایش امتدادپذیری پوست و مفاصل، بهبود ضعیف زخم و تغییر شکل‌های عضلانی- اسکلتی می‌باشند. برخی بیماران یک شکل جهش‌یافته لیزیل هیدروکسیلاز با ثابت میکائیلیس بالاتر برای اسید آسکوربیک نسبت به آنزیم طبیعی را دارند. لذا به دوزهای بالای اسید آسکوربیک پاسخ می‌دهند.

سندروم اهلرز- دانلوس، نوع VII (OMIM۲۲۵۴۱۰)

در این حالت پوست به‌راحتی دچار خونمردگی شده و امتدادپذیری بالایی دارد، ولی تظاهرات اصلی شامل جابه‌جایی مفاصل اصلی نظیر مفصل ران و زانوها می‌باشند. شلی لیگامان‌ها می‌تواند به دلیل برداشت ناقص پروپپتید انتهای آمینوی زنجیرهای پروکلاژن رخ دهد. یکی از انواع ناشی از کمبود پروکلاژن N- پروتئاز، تحت عنوان ADAMTS2، است. کمبود مشابهی در بیماری اتوزومال مغلوبی به‌نام dermatosparaxis گاوها، گوسفندان و گربه‌ها رخ می‌دهد که در آن سُستی پوست آنقدر زیاد است که سبب مرگ می‌شود. در سایر انواع زنجیرهای $pro\alpha1(I)$ و $Pro\alpha2(I)$، به دلیل برداشت یک اگزون این ژن‌ها، فاقد اسید آمینه در جایگاه شکست هستند. این حالت مانع تجزیه طبیعی توسط پروکلاژن N- پروتئاز می‌شود.

سندروم شاخ پس‌سری[3] (OMIM۳۰۴۱۵۰)

سندروم شاخ پس‌سری که سندروم اهلرز دانلوس IX یا پوست شل[4] نیز نامیده می‌شود، با سندروم موی تاب‌دار منکز[5] مرتبط است. نقص‌هایی در ژن کدکننده ATPase انتقال‌دهنده مس گلژی- ترانس زمینه‌ساز این بیماری‌ها هستند که به‌صورت یک کمبود فعالیت لیزیل اکسیداز وابسته

1. Osteogenesis imperfecta
2. Ehlers-Danlos syndrome
3. Occipital horn syndrome
4. Cutis laxa
5. Menkes kinky hair syndrome

ارتباط بالینی ۱۳-۶ (ادامه)

به مس و بنابراین نقص‌هایی در ایجاد اتصالات عرضی در کلاژن، ظاهر می‌شود. مشخصه‌های سندروم شاخ پس‌سری شامل پوست نرم و شل و ظهور شاخ‌های پس‌سری استخوانی در طی دوره نوجوانی می‌باشند. در سندروم موی تابدار منکز، یک ناهنجاری متغیر ولی معمولاً شدیدتر، بیماران معمولاً مشکلات عصبی نظیر تشنج و تأخیر در نمو، نارسایی رشد مناسب، موی خاص، و گاهی مرگ در طفولیت یا کودکی را نشان می‌دهند. خانمی که مقادیر بالای داروی پنی‌سیلامین، شلاته‌کننده (برداشت‌کننده) مس، را مصرف می‌کند، طفلی را به دنیا می‌آورد که مبتلا به سندروم اکتسابی اهلرز - دانلوس - مانند می‌باشد که بعداً بهبود می‌یابد. اثرات جانبی درمان با پنی‌سیلامین شامل بهبود ضعیف زخم و پوست با انعطاف‌پذیری بالا می‌باشد. حیوانات دچار کمبود مس همچنین اتصالات عرضی ضعیف در الاستین و کلاژن را نشان می‌دهند که دوباره به‌دلیل نیاز به یون مس برای لیزیل اکسیداز است.

آسکوربوت و سنتز هیدروکسی‌پرولین

اکثر حیوانات، ولی نه انسان، قابلیت سنتز اسید آسکوربیک (ویتامین C) را دارند. از نظر تاریخی، آسکوربوت با سفرهای دریایی طولانی و کمبودهای ویتامین C ناشی از کمبود میوجات و سبزیجات تازه ارتباط دارد. تظاهرات بالینی شامل بهبود ضعیف ضخم، افزایش شکنندگی استخوانی و خونمردگی‌های شدید، خونریزی لثه و جلوگیری از فرایند منظم رشد استخوان در کودکان می‌باشد. در میان مشکلات دیگر، کمبود اسید آسکوربیک منجر به کاهش سنتز هیدروکسی‌پرولین به دلیل نیاز پیرولیل هیدروکسیلاز به این ویتامین می‌شود. هیدروکسی‌پرولین اتم‌های دیگری را برای ایجاد پیوند هیدروژنی فراهم می‌کند که سبب تثبیت مارپیچ سه‌رشته کلاژن می‌شود. کلاژن حاوی مقادیر ناکافی هیدروکسی‌پرولین به میزان قابل توجهی کمتر از کلاژن طبیعی در حرارت بدن پایدار است. کمبود شدید اسید آسکوربیک به‌طور ثانویه منجر به کاهش میزان سنتز پروکلاژن می‌شود.

اختصاصی‌تری برای پروتئین‌ها یا گروهی از پروتئین‌های خاص انجام شود. مؤثرترین مکانیسم‌های متداول برای تنظیم ترجمه در مرحله شروع بوده و فسفریلاسیون فاکتورهای شروع، برحسب شرایط، می‌تواند سبب سرکوب یا تحریک ترجمه شود.

شناخته‌شده‌ترین مکانیسم تنظیم کلی ترجمه مستلزم فسفریلاسیون سرین ۵۱ زیر- واحد α در eIF2 می‌باشد. تحت شرایطی نظیر گرسنگی غذایی، شوک حرارتی، و عفونت ویروسی، **eIF2** فسفریله می‌شود. این فاکتور وظیفه‌دار باقی می‌ماند، ولی **eIF2-GDP** اتصال محکمی با **IF2B** برقرار می‌کند که فاکتور تعویض نوکلئوتید گوانینی است. **eIF2** به میزان محدودی وجود دارد و لذا برای تعویض نوکلئوتید در دسترس قرار نخواهد داشت؛ به‌همین ترتیب **eIF2-GTP** برای شروع در دسترس نخواهد بود. به شکل متناقض، فسفریلاسیون **eIF2** سبب تحریک ترجمه یک فاکتور رونویسی می‌شود که نتیجه آن تنظیم - افزایشی ژن‌های پاسخ به استرس می‌باشد.

فسفریلاسیون eIF2 می‌تواند توسط یک **کیناز تحت تنظیم هِم** کاتالیز شود که در غیاب هم فعال است. این کیناز در بسیاری از سلول‌ها وجود دارد، ولی در رتیکولوسیت‌ها بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است که هموگلوبین را سنتز می‌کنند. کمبود منبع انرژی یا هر نوع پیش‌ساز هِم، این کیناز را فعال می‌کند. با اتصال **ds-RNA** حاصل از عفونت ویروسی، یک **کیناز وابسته به RNA دو- رشته** مرتبط فعال می‌شود. تولید این کیناز توسط اینترفرون نیز القاء می‌شود.

برعکس، فاکتور شروع **eIF4E** با فسفریلاسیون یک ریشه سرین در پاسخ به مثلاً

فاکتورهای رشد، فعال می‌گردد. این فسفریلاسیون با اتصال پروتئین‌های اتصالی -eIF4E مهاری تداخل می‌کند. واکنش عکس توسط یک پروتئین فسفاتاز، برای مثال، به دنبال یک عفونت ویروسی انجام می‌شود. این اثرات توسط eIF4G وساطت می‌گردند که آن هم با فسفریلاسیون فعال می‌شود.

تنظیم ترجمه ملکول‌های mRNA اختصاصی در تنظیم مقادیر و بنابراین تعادل پروتئین‌ها در یک سلول مهم است. متمرکزسازی و بسته‌بندی ملکول‌های mRNA این امکان را فراهم می‌سازد تا پیام‌ها در محل‌هایی ترجمه شوند که مورد نیاز هستند و یا ملکول‌های mRNA ذخیره شوند تا در آینده مورد استفاده قرار گیرند. تمرکزایی در داخل سلول وابسته به توالی‌هایی در RNA، تحت عنوان عناصر **هدفمندسازی**[1] (یا زیپ کد[2] یا عناصر تمرکزایی[3]) می‌باشد که با پروتئین‌های اتصال به RNAای تعامل می‌کنند که ملکول‌های mRNA را در محل‌های تحت‌سلولی متمرکز می‌کنند. گاهی پیام‌ها طی نمو در داخل گرانول‌های ذخیره‌ای یا **اجسام P**[4] بسته‌بندی می‌شوند؛ این اجسام تجمعاتی متشکل از ملکول‌های mRNAای که ترجمه آنها سرکوب شده است، پروتئین‌های تنظیمی و آنزیم‌های زوال mRNA[5] هستند. این ملکول‌های mRNA ممکن است تخریب شوند، ولی همچنین می‌توانند ذخیره شده و برای ترجمه دوباره به سیتوپلاسم برگردانده شوند. اجسام P به برنامه‌ریزی مجدد ترجمه در زمان استرس کمک می‌کند.

نمونه واضح تنظیم پیک - اختصاصی، تنظیم سنتز فریتین به‌عنوان پروتئین اتصالی آهن می‌باشد. در غیاب آهن، یک پروتئین سرکوبگر به **عنصر پاسخ به آهن**[6] (IRE) اتصال می‌یابد که یک ساختمان ساقه - قوس موجود در توالی '۵ - رهبر ملکول mRNA فریتین می‌باشد (ص.۱۴۴۹). این mRNA برای استفاده در آینده پنهان می‌شود. اسید δ-آمینو-لوولینیک نیز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های بیوسنتز هِم، توسط یک IRE - '۵ موجود در mRNA خود تنظیم می‌شود. برعکس، در هنگام محدودیت آهن، نیاز به گیرنده فریتین می‌باشد؛ mRNA این گیرنده حاوی تعدادی IRE در ناحیه '۳ - ترجمه‌نشونده خود می‌باشد. اتصال پروتئین سرکوبگر سبب تثبیت این mRNA و افزایش طول‌عمر آن می‌شود. بسیاری از ملکول‌های mRNA تحت تنظیم رشد، شامل انواع مربوط به پروتئین‌های ریبوزومی، یک قطعه پلی‌پیریمیدینی در توالی رهبر خود دارند. یک پروتئین اتصالی پلی-پیریمیدین به تنظیم ترجمه آنها کمک می‌کند.

علاوه‌بر نقش خود در انتقال اطلاعات (mRNA) و ترجمه (rRNA ،tRNA)، RNA اهمیت زیادی در تنظیم بیان ژن چندین فعالیت بیولوژیکی، اغلب به شکل اختصاصی بافت، دارد. چندین کلاس ملکول‌های RNA کوچک به گروه‌های اختصاصی پروتئین‌ها اتصال می‌یابند و با mRNA در جهت تنظیم رونویسی و ترجمه، طی فرایندی به‌نام

1. Targeting elements
2. Zip codes
3. Localization elements
4. P bodies
5. mRNA decay enzymes
6. Iron response element

خاموش‌سازی RNA[1] یا **تداخل RNA**[2]، تعامل می‌کنند. در انسان تقریباً ۵۰۰ ژن **micro-RNA (miRNA)** وجود دارد. ملکول‌های RNA بزرگتر سنجاقی در هسته توسط یک نوکلئاز **دروشا**[3] و سپس در داخل سیتوپلاسم توسط آندونوکلئازی به‌نام **دایسر**[4] پردازش می‌شوند تا تولید ملکول‌های RNA دو-رشته به طول ۲۳-۲۱ نوکلئوتید شود. یک RNA هلیکاز رشته‌ها را جدا می‌کند یکی از آنها به یک **کمپلکس خاموش‌سازی القاءشده توسط RNA**[5] **(RISC)** اتصال می‌یابد که یکی از اجزاء مرکزی آن یک پروتئین **آرگونات**[6] می‌باشد. این RISC سبب هدایت miRNA به توالی‌های مکمل mRNA، اغلب در ناحیه ′۳-ترجمه‌نشونده، می‌شود. تولید یک دو رشته ناقص mRNA-miRNA سبب سرکوب ترجمه می‌شود، ولی اثر فوری بر پایدار mRNA ندارد. تعامل تعاونی چندین ملکول miRNA با یک ملکول mRNA، کارایی مهار را افزایش می‌دهد. کمپلکس‌های miRNAmRNA ممکن است برای ذخیره‌سازی یا تخریب به **اجسام P** هدایت شوند. دایسر و RISC همچنین تولید دورشته‌های کاملاً مکملی از ملکول‌های RNA کوچک با mRNA می‌کنند. این کمپلکس‌ها منجر به تجزیه و غیرفعال‌سازی mRNA هدف توسط یک آندونوکلئاز RISC به‌نام **اسلایسر**[7] و سایر نوکلئازهای تخریب‌کننده mRNA می‌شود.

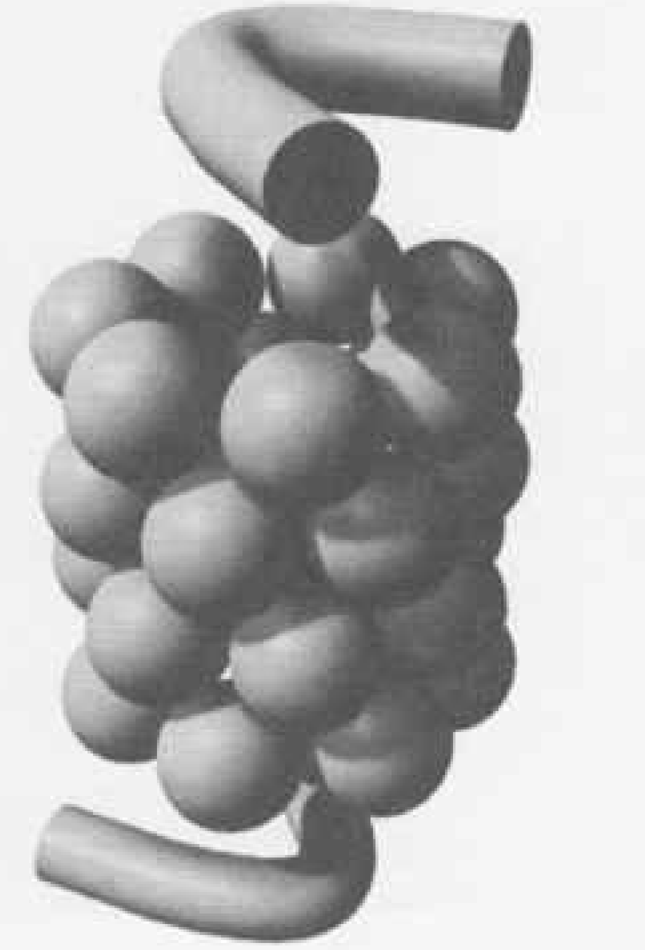
چندین کلاس دیگر RNA کوچک نیز شناخته شده‌اند. ملکول‌های **RNA مداخله‌گر کوچک**[8] **(siRNA)** از RNA دو-رشته تولید می‌شوند؛ این ملکول‌ها ممکن است منشاء داخلی یا ویروسی داشته باشند و همانند miRNA عمل می‌کنند. کلاس‌های دیگر از توالی‌های تکراری DNA رونویسی می‌شوند، از رونوشت‌های تک-رشته مشتق می‌شوند، و ممکن است بزرگتر از ملکول‌های miRNA باشند. RNAi مداخله‌گری که به‌طریق شیمیایی سنتز شده است، از miRNA تقلید کرده و ابزار آزمایشگاهی و عامل درمانی بالقوه با ارزشی است.

۸-۶ • تخریب و نوسازی پروتئینی

عمر پروتئین‌ها بسیار متنوع می‌باشد. سلول‌های عدسی جایگزین نشده و پروتئین‌های آنها نوسازی نمی‌شوند. هموگلوبین ۱۲۰ روز عمر خود را در گلبول‌های قرمز سپری می‌کند. برخی پروتئین‌های انعقاد خون تنها چند روز عمر دارند، لذا هموفیلی‌ها بعد از انتقال خون یا تزریق فاکتورهای مورد نیاز، آنها را تنها برای یک دوره کوتاه دارند. دیابتی‌ها نیاز به تزریق مکرر انسولین دارند، زیرا نیاز هورمونی متفاوت است (ارتباط بالینی ۸-۲۱ را ببینید). آنزیم‌های متابولیکی برحسب نیاز یا تغییر حالت، از نظر کمّی تغییر می‌کنند؛ برای مثال، غلظت آنزیم‌های چرخه اوره در پاسخ به رژیم غذایی تغییر می‌کند. پروتئین‌ها همچنین با اکسیداسیون، پروتئولیز، دناتوراسیون یا سایر تغییرات غیرقابل برگشت، دچار آسیب می‌شوند. خطاهای

1. RNA silencing
2. RNA interference
3. Drosha
4. Dicer
5. RNA-induced silencing complex
6. Argonaute
7. Slicer
8. Small interfering RNA

ترجمه و تاشدن منجر به تولید پروتئین‌های غیروظیفه‌دار شده و پردازش پروتئولیتیک همراه با تولید پپتیدهای غیروظیفه‌داری نظیر پپتید C از پروانسولین است. نیاز به مکانیسم‌هایی برای برداشت می‌باشد: پروتئولیز پروتئین‌های ناخواسته را به پپتیدها و نهایتاً اسیدهای آمینه تجزیه می‌کند. اکثر این اسیدهای آمینه دوباره در سنتز پروتئین‌های جدید مورد استفاده قرا می‌گیرند، ولی برخی متابولیزه شده و محصولات حاصل از تجزیه آنها دفع می‌گردند. پروتئازهای گوارشی نظیر پپسین، تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز پروتئین غذایی را هیدرولیز کرده و نقشی در نوسازی پروتئین داخل سلولی ندارند، ولی اسیدهای آمینه‌ای که توسط آنها تولید می‌شوند، به مخزن متابولیکی اضافه می‌گردند که در هنگام ترجمه مصرف می‌شوند. این موضوع به‌خصوص برای اسیدهای آمینه ضروری لازم است (جدول ۱-۱۹ را ببینید).



شکل ۲۲-۶ **مدل پروتئازوم.** یک قطعه مرکزی 20S که شامل ۱۵-۱۲ پلی‌پپتید متفاوت می‌باشد، چهار حلقه هپتامری متراکم را با یک سوراخ مرکزی به وجود می‌آورند که شامل چندین پروتئاز با ویژگی‌های مختلف می‌باشد. قطعات V شکل موجود در دو انتها، کلاهکی را برای این استوانه به‌وجود می‌آورند که در فرایندهای وابسته به ATP شناسایی، بازنمودن و جابه‌جای به داخل استوانه، سوبسترا فعالیت دارند. ساختمان کلاهک بالایی به‌صورت جداشده از قطعه مرکزی نشان داده شده است تا سوراخ مرکزی این استوانه قابل مشاهده باشد.

پروتئولیز وابسته به ATP در داخل پروتئازوم‌ها رخ می‌دهد

شناخته‌شده‌ترین مسیر پروتئولیتیک با استفاده از پروتئازوم‌ها انجام می‌شود که ساختمان‌های دمبلی-شکل با حدود ۲۹ پلی‌پپتید می‌باشند (شکل ۲۲-۶). در هر انتهای قسمت مرکزی استوانه‌ای، درپوشی از کمپلکس‌های V- شکل وجود دارد که طی یک فرایند وابسته به ATP به شناسایی، بازنمودن و انتقال پلی‌پپتیدها به داخل قسمت مرکزی پروتئولیتیک کمک می‌کنند. هدفمندسازی به پروتئازوم به‌طورطبیعی نیاز به **اوبی‌کوئیتین** دارد که یک پروتئین شدیداً حفظ‌شده ۷۶ اسید آمینه‌ای است. همان‌طور که در شکل ۲۳-۶ نشان داده شده است، پروتئین‌ها برای تخریب به طریق **پلی‌اوبی‌کوئیتینیلاسیون**[1] نشاندار می‌شوند. اوبی‌کوئیتین توسط آنزیم E1 فعال‌شده تا یک پیوند تیواستری ایجاد کند؛ نیاز به ATP بوده و یک کمپلکس AMP-اوبی‌کوئیتین موقتی تولید می‌شود. سپس اوبی‌کوئیتین به آنزیم E2 و نهایتاً از طریق یکی از اعضاء گروه کمپلکس‌های چندپروتئینی E3 به یک پروتئین هدف، انتقال داده می‌شود. اتصال اوبی‌کوئیتین از طریق پیوندهای **ایزوپپتیدی** بین گروه‌های ε-آمینوی ریشه‌های لیزین پروتئین و ریشه‌های گلیسین انتهای کربوکسیل اوبی‌کوئیتین صورت می‌پذیرد. چندین ملکول اوبی‌کوئیتین به پروتئین و به یکدیگر اتصال می‌یابند و پروتئین پلی‌اوبی‌کوئیتینیله برای تخریب به پروتئازوم انتقال داده می‌شود؛ یک **ایزوپپتیداز** اوبی‌کوئیتین را برای استفاده مجدد آزاد می‌کند. پروتئین‌های آسیب‌دیده، ناقص، بدتاشده و جهش‌یافته سریعاً از طریق مسیر اوبی‌کوئیتین تخریب می‌شوند و انباشتگی پروتئین تخریب‌نشده می‌تواند منجر به بیماری شود (ارتباط بالینی ۱۴-۶). برای مثال، حذف یک اسید آمینه سبب تغییر پایداری پروتئین CFTR در بیماری فیبروزکیستیک می‌شود (ارتباط بالینی ۷-۶). انتخاب پروتئین‌های بومی برای تخریب بستگی به ویژگی آنزیم E3 دارد؛ هم کونفورماسیون و هم توالی اسید آمینه‌ای مهم هستند. توالی‌های ناپایدارکننده PEST (غنی از Pro، Glu، Ser، و Thr) در چندین پروتئین با عمر کوتاه وجود دارند و یک موتیف تعاملگر با اوبی‌کوئیتین مورد

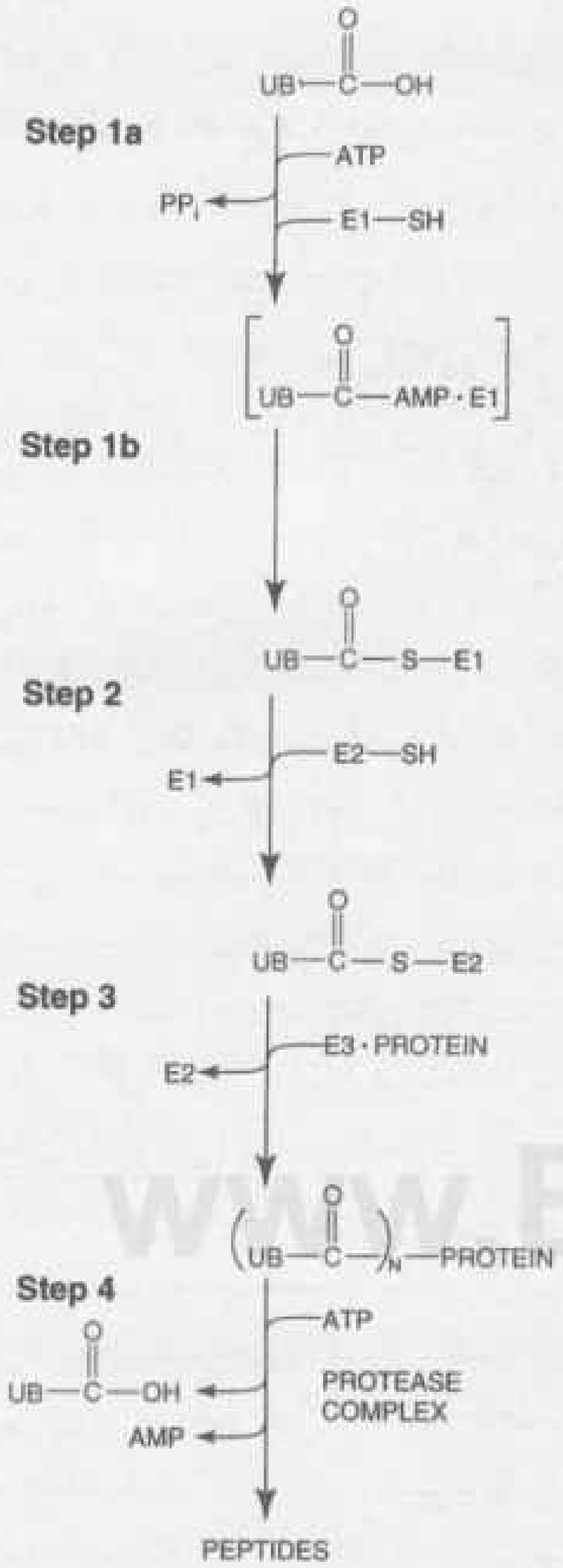
1. Polyubiquitinylation

شناسایی قرار گرفته است که به اوبی‌کوئیتین متصل می‌شود و همچنین گاهی اوبی‌کوئیتینیلاسیون را تسریع می‌کند. شاخص دیگر، ماهیت اسید آمینه انتهای آمینو می‌باشد. طبق **قاعده انتهای آمینو**[1]، پروتئین‌های دارای ریشه‌های انتهای آمینوی متفاوت، با سرعت‌های بسیار متفاوتی تخریب می‌شوند، و عمر پروتئین را می‌توان با قراردادن یک ریشه ناپایدارکننده انتهای آمینو از یک دهنده آمینوآسیل -tRNA، تغییر داد. پروتئین‌های بدتاشده موجود در ER معمولاً از طریق مسیر اوبی‌کوئیتین تخریب می‌شوند. چاپرون‌ها و لکتین‌های موجود در ER، مانع ایجاد تجمعات مربوط به گلیکوپروتئین‌های با اتصال N بدتاشده می‌شوند و آنها را برای برگشت دوباره به داخل سیتوزول طی فرایند **ERAD (تخریب مرتبط با ER)**، هدفمند می‌کنند.

پروتئولیز وابسته به اوبی‌کوئیتین یک نقش اساسی در تنظیم حوادث سلولی دارد. سیکلین‌ها (ص ۱۳۳۲) و پروتئین تیروزین کینازهای گیرنده‌ای (ص ۷۰۱) در کنترل تقسیم سلولی نقش دارند. تخریب وابسته به اوبی‌کوئیتین یک سیکلین به سلول اجازه می‌دهد تا از فاز M به فاز G1 برود، در حالی که تخریب گیرنده‌ها مانع هدایت پیام شده و تکثیر سلول را متوقف می‌سازد. پروتئین‌های دیگری که توسط پروتئولیز وابسته به اوبی‌کوئیتین تجزیه می‌شوند، شامل فاکتورهای رونویسی، فرونشاننده تومور p53 و انکوپروتئین‌ها، پروتئین کینازها و سیستم ایمنی و گیرنده‌های سطح سلولی دیگر می‌باشند.

پلی‌اوبی‌کوئیتینیلاسیون برای پیام‌دهی پروتئولیز ضروری است؛ برای مثال، p53- پلی‌اوبی‌کوئیتینیله تخریب می‌شود، در حالی که p53- منواوبی‌کوئیتینیله برای انتقال به خارج هسته هدفمند می‌گردد. نقص در پروتئولیز وابسته به اوبی‌کوئیتین منجر به بیماری می‌شود (ارتباط بالینی ۱۵-۶). نقش‌های دیگر اوبی‌کوئیتین در یک نگاه دقیق‌تر ۴-۶ شرح داده شده‌اند.

همانند پروتئازوم‌ها، کمپلکس پروکاریوتی پروتئازهای Lon و Clp و FtsH برای فعالیت خود نیاز به هیدرولیز ATP دارند، ولی اوبی‌کوئیتین در پروکاریوت‌ها وجود ندارد. این پروتئازهای همچنین به صورت ساختمان‌های بشکه-مانندی همایش می‌یابند و ATPase نیروی بازشدن پروتئین سوبسترا را فراهم می‌کند. قاعده انتهای آمینو از طریق تعداد کمتری از اسیدهای آمینه ناپایدارکننده انتهای آمینو به اجرا گذاشته می‌شود.



شکل ۲۳-۶ تخریب پروتئینی وابسته به ATP و اوبی‌کوئیتین. اوبی‌کوئیتین در یک واکنش دو- مرحله‌ای فعال می‌شود که مستلزم تولید یک انیدرید مخلوط AMP و انتهای کربوکسی اوبی‌کوئیتین (مرحله ۱a) و به دنبال آن تولید یک تیواستر با آنزیم E1 (مرحله ۱b) می‌باشد. آنزیم E2 یک تیواستر با اوبی‌کوئیتین ایجاد می‌کند (مرحله ۲) و به‌عنوان دهنده در انتقال اوبی‌کوئیتین به پروتئین هدف که توسط E3 کاتالیز می‌شود، عمل می‌کند (مرحله ۳). در این مرحله، چندین ملکول اوبی‌کوئیتین دیگر به ریشه‌های لیزین اوبی‌کوئیتین یا سایر ریشه‌های لیزین پروتئین هدفمندشده اتصال می‌یابند. پروتئین پلی‌اوبی‌کوئیتینه به طریق پروتئولیز وابسته به ATP تخریب می‌گردد (مرحله ۴)؛ اوبی‌کوئیتین تخریب نمی‌شود و دوباره می‌تواند وارد مرحله ۱ این فرایند گردد.

هضم داخل‌سلولی برخی پروتئین‌ها در داخل لیزوزوم‌ها رخ می‌دهد

هضم داخل‌سلولی پروتئین‌ها خارج‌سلولی در داخل **لیزوزوم‌های** غنی از پروتئاز انجام می‌شود. موادی که نمی‌توانند از غشاء پلاسمایی عبور کنند، با آندوسیتوز انتقال داده می‌شوند. در **پینوسیتوز** ذرات بزرگ، تجمعات ملکولی، یا سایر مواد موجود در مایع خارج‌سلولی برداشت می‌شوند. ماکروفاژها باکتری‌ها و سلول‌های مرده را با این مکانیسم می‌خورند. **آندوسیتوز**

1. N-end rule

ارتباط بالینی ۱۴-۶

بدتاشدگی و تجمع پروتئینی: بیماری هانتینگتون و بیماری آلزایمر

پروتئین‌های بدتاشده معمولاً همانند حالتی که در مورد پروتئین CFTR جهش‌یافته در فیبروزکیستیک رخ می‌دهد (ارتباط بالینی ۷-۶ را ببینید)، تخریب می‌شوند. نتیجه تجمع سلولی پروتئین‌های بدتاشده یا محصولات تجزیه نسبی آنها، در چندین بیماری عصبی قابل مشاهده است.

بیماری هانتینگتون (OMIM ۱۴۳۱۰۰) یک ناهنجاری نورودژنراتیو اتوزومال غالب است که در آن مبتلایان حرکات اسپاسمی را در عضلات ارادی، تغییرات شخصیتی و اختلالات شناختی را نشان می‌دهند که تمامی آنها با گذشت زمان بدتر می‌شوند. بیماری هانتینگتون با انباشتگی تجمعات پروتئینی مشتق از **هانتینگتین** همراه می‌باشد که اساساً یک پروتئین سیتوزولی است. هانتینگتون[1] برای نمو رویانی ضروری است و در تنظیم رونویسی، تردد وزیکولی و سیناپس نقش دارد، ولی مکانیسم‌های آنها به‌خوبی مشخص نشده‌اند. واریانت‌هایی از هانتینگتین در بیماری هانتینگتون نقش دارند؛ یک کدون CAG موجود در داخل ژن توسعه یافته است که نتیجه آن تکرارهایی از پلی‌گلوتامین به تعداد ۳۵ تا ۱۸۰ ریشه در هانتینگتین می‌باشد. تکرارهای بلندتر پلی‌گلوتامین با بیماری شدیدتر مرتبط است. پروتئین و پپتیدهای حاصل از هانتینگتین در داخل انکلوزیون‌هایی در داخل هسته انباشته شده و رونویسی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. عملکرد میتوکندری نیز مختل شده، تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن افزایش یافته و مسیر اوبی-کوئیتین-پروتئازوم مختل می‌گردد. چندین ناهنجاری نورودژنراتیو دیگر نیز با توسعه قطعه پلی‌گلوتامینی و رسوب پروتئین در ارتباط هستند.

بیماری آلزایمر (OMIM ۱۰۴۳۰۰) با کاهش پیشرونده حافظه و شناخت مشخص شده و در افراد مسن شایع‌تر است. اختلال در عملکرد میتوکندری سلول‌های عصبی شایع است. بیماری آلزایمر با انباشتگی دستجات و فیلمان‌های داخل نورونی و خارج سلولی مشخص می‌شود که تولید پلاک می‌کنند. جزء اصلی پلاک را β-آمیلوئید تشکیل می‌دهد که یک پپتید ۴۳-۳۹ ریشه‌ای مشتق از یک پروتئین پیش‌ساز آمیلوئیدی بزرگتر است. اجزاء دیگر شامل گانگلیوزید GM1، یک پروتئین مرتبط با میکروتوبول Tau، و سایر اجزاء شدیداً اوبی‌کوئیتینه ولی مقاوم به پروتئاز به صورت فیبرهای متراکم و درهم پیچیده می‌باشند که به‌نظر می‌رسد مسیر تخریبی پروتئازوم را پُر می‌کند. امکان دارد اختلال در تنظیم یون کلسیم زمینه‌ساز مرگ عصبی باشد.

اسکلروز جانبی آمیوتروپیک[2] (ALS یا بیماری لو گریگ[3]) یک بیماری نورودژنراتیو است که با دژنراسیون نورون‌های حرکتی و انباشتگی پروتئین‌های اوبی‌کوئیتینه در انکلوزیون‌های سلولی مشخص می‌شود. در هر دو شکل خانوادگی و تک‌گیر بیماری، هم سوپراکسید دیس‌موتاز ۱ و پروتئین اتصال به **TAR DNA** در داخل انکلوزیون‌ها مورد شناسایی قرار گرفته‌اند.

بیماری پارکینسون (ارتباط بالینی ۱۹-۱۹ را ببینید) نیز با انباشتگی تجمعات پروتئینی تخریب‌نشده ارتباط دارد. بدتاشدگی پروتئین پیش‌سیناپسی آلفا- سینوکلئین[4] ($\alpha-$Syn) در شبکه آندوپلاسمی (ER) نورون‌ها منجر به تشکیل اجسام لوی[5] می‌شود که $\alpha-$Syn جزء اصلی آنها را تشکیل می‌دهد. تخریب مرتبط با ER پروتئین‌ها مختل می‌باشد. در بیماری پارکینسون با شروع در سن بالا، معمولاً اجسام لوی وجود ندارند و جهش در پروتئین پارکین شایع می‌باشد (ارتباط بالینی ۱۵-۶) را ببینید. بیماری‌های پرایونی نیز با تجمع پروتئینی در ارتباط است (ارتباط بالینی ۶-۳ را ببینید).

---

۱. احتمالاً منظور «هانتینگتین» است، مترجم

2. Amyotropic lateral sclerosis
3. Lou Gehrig's disease
4. Alpha-synuclein
5. Lewy bodies

به‌واسطه گیرنده با استفاده از گیرنده‌های سطح سلولی برای اتصال به ملکول‌های اختصاصی در حفرات موجود در سطح سلول انجام می‌شود که توسط پروتئین چندزیرواحدی کلاترین پوشیده شده‌اند. درون‌کشی[1] غشاء پلاسمایی و گیرنده‌های متصل به غشاء همراه با تولید وزیکول‌های داخل سلولی پوشیده از کلاترین می‌باشد که یکی از سرنوشت‌های آنها ادغام

---

1. Invagination

ارتباط بالینی ۱۵-۶

نقص‌هایی در سیستم اوبی‌کوئیتین- پروتئازوم

بیماری‌های زیر با اختلال در عملکرد مسیر اوبی‌کوئیتین- پروتئازوم ارتباط دارند.

سندروم لیدل (OMIM ۱۷۷۲۰۰): جهش در یک زیرواحد کانال سدیمی اپی‌تلیال کلیه با اتصال Nedd4 و E3 لیگاز تداخل می‌کند که خود تخریب آن را وساطت می‌کند. انباشتگی کانال منجر به بازجذب زیادی Na^+ و در نتیجه فشار خون بالای شدید می‌شود.

پارکینسونیسم اتوزومال مغلوب جوانان[1] (OMIM ۶۰۵۹۰۹): درصد کمی از بیماران شکل خانوادگی بیماری پارکینسون با شروع زودرس را دارند. بسیاری از اینها جهش‌هایی را در پروتئین پارکین دارند که سبب کاهش فعالیت آنزیم E3 و انباشتگی سوبستراهای پارکین می‌شوند. علت دیگر بیماری پارکینسون خانوادگی با جهشی در آنزیمی مرتبط است که سبب چرخش مجدد اوبی‌کوئیتین می‌شود که احتمالاً نتیجه آن کاهش اوبی‌کوئیتین آزاد می‌باشد.

سرطان پستان و تخمدان: در برخی موارد سرطان پستان و تخمدان جهش‌های هتروزیگوتی در BRCA1 (لوکوس حساسیت سرطان پستان[2]) مشاهده می‌گردد. پروتئین BRCA1 یک آنزیم E3 است که فعالیت آن در اثر جهش‌های یافت‌شده در سرطان خانوادگی پستان وجود ندارد.

سرطان سرویکال ناشی از HPV: عفونت با برخی سوش‌های ویروس پاپیلومای انسانی می‌تواند منجر به سرطان سرویکال مهاجم شود. یک اونکوپروتئین E6 کدشده توسط ویروس، با پروتئین فرونشاننده تومور p53 سلولی تعامل می‌کند؛ یک آنزیم E3 این کمپلکس را شناسایی نموده که نتیجه آن تخریب p53 از طریق مسیر اوبی‌کوئیتین- پروتئازوم می‌باشد.

1. Autosomal recessive juvenile Parkinsonism
2. Breast cancer susceptibility locus

یک نگاه دقیق‌تر ۶-۴

اوبی‌کوئیتین و SUMO

اوبی‌کوئیتین نقش‌های مهمی را در تخریب پروتئین دارد. اتصال قابل برگشت اوبی‌کوئیتین به هیستون‌های H2A و H2B با بازسازی ارتباطی ندارد، زیرا این پروتئین‌ها پایدار هستند، ولی این تغییر بر روی ساختمان و رونویسی کروماتین تأثیر می‌گذارد. اوبی‌کوئیتین در صف‌بندی و جدایی کروموزم، در ترمیم DNA و در تنظیم رونویسی طی پاسخ التهابی همکاری دارد. اوبی‌کوئیتیناسیون پیامی برای آندوسیتوز و یک پیام دسته‌بندی پیام برای هدایت محتویات به لیزوزوم‌ها است. اغلب در این فعالیت‌ها از اتصالات اوبی‌کوئیتینی استفاده می‌شود که متفاوت از انواع موجود در مسیر پروتئازوم هستند. پروتئین‌های تغییردهنده کوچک مرتبط با اوبی‌کوئیتین[1] (SUMO) نیز که کونفورماسیون و اتصال آنها به پروتئین‌های هدف بسیار شبیه به اوبی‌کوئیتین است، در تنظیم رونویسی و سایر جنبه‌های تنظیم سلولی، گاهی با اثرات مخالف اوبی‌کوئیتین، فعالیت دارند.

1. Small ubiquitin-related modifier

با یک لیزوزوم و تخریب محتویات آن می‌باشد. مقداری از نوسازی پروتئین داخل سلولی نیز ممکن است در داخل لیزوزوم‌ها رخ دهد و در شرایط خاص ممکن است مقادیر قابل‌توجهی از مواد سلولی توسط لیزوزوم‌ها تجزیه شوند. برای مثال، گرسنگی سرمی[1] فیبروبلاست‌ها یا گرسنگی موش‌های صحرایی منجر به تخریب لیزوزومی جمعیتی از پروتئین‌های سلولی

1. Serum starvation

می‌شود. این فرایند نیز مستلزم شناسایی یک توالی پپتیدی اختصاصی است که دوباره نشان می‌دهد عمر یک پروتئین نهایتاً توسط توالی آن مشخص می‌گردد.

سیستم‌های پروتئولیتیک دیگر

آپوپتوز (ص ۱۳۴۰) که مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده نیز نامیده می‌شود، به دنبال فعال‌سازی پروتئولیتیک پروتئازهایی تحت عنوان کاسپاز (سیستئین آسپارتیل پروتئازها) رخ می‌دهد. استرس‌هایی نظیر التهاب، آسیب سلولی، یا کمبود فاکتورهای رشد، می‌توانند به‌طور مستقیم سبب فعال‌سازی کاسپازها شده و یا سبب آزادسازی سیتوکروم c و فاکتورهای دیگری از میتوکندری شوند که یک آبشار کاسپازی را فعال نموده و منجر به تخریب سریع پروتئین‌های سلولی می‌گردد. یک کاسپاز موجود در ER در آپوپتوز ناشی از استرس ER فعالیت می‌کند، در حالی که پروتئازهای دیگر گلژی و ER پروتئین‌های بدتاشده و قطعات پپتیدی حاصل از بلوغ پروتئین‌ها در مسیر ترشحی را تخریب می‌کنند. همچنین پروتئین‌ها برای تخریب توسط پروتئازوم‌ها، به خارج ER انتقال داده می‌شوند.

پروتئازهای وابسته به کلسیم که کالپین[1] نامیده می‌شوند، در اکثر سلول‌ها وجود دارند و در مثلاً تکثیر، تمایز، و پیشرفت از میان چرخه سلولی از طریق پروتئولیز انتخابی و محدود، عمل می‌کنند. کالپین‌ها همچنین با پروتئازوم‌ها در نوسازی پروتئینی فعالیت می‌کنند، و نقش‌های دیگری نیز نشان داده شده‌اند، ولی این نقش‌ها به‌خوبی مشخص نشده‌اند. به‌نظر می‌رسد که تخریب پروتئینی به اندازه فرایندی نظیر سنتز پروتئین، پیچیده و مهم می‌باشد.

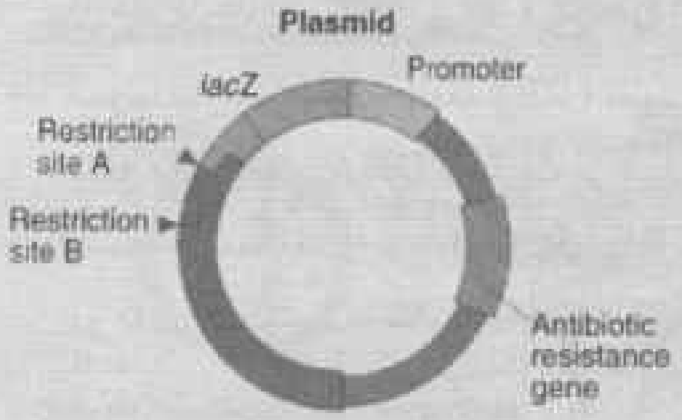
واژه‌های کلیدی

ترجمه
منوسیسترونی
پلی‌سیسترونی
کدون‌ها
آنتی‌کدون‌ها
کدون‌های شروع
کدون‌های خاتمه
کد ژنتیکی
فاکتورهای شروع
فاکتورهای طویل‌سازی
فاکتورهای خاتمه
آمینوآسیل-tRNA سنتتاز
جهش‌های نقطه‌ای
جهش‌های خاموش
جهش‌های تغییرقالب
جهش‌های فرونشاننده
جهش‌های خاتمه
ریبوزوم
پلی‌زوم
پپتیدیل ترانسفراز
تغییر بعد از ترجمه
چاپرون
شبکه آندوپلاسمی
پپتیداز پیام
پپتید پیام
ذره شناسایی پیام
ترانس‌لوکون
گلیکوزیلاسیون با اتصال N
گلیکوزیلاسیون با اتصال O
اولیگوساکارید نوع کمپلکس
گلیکوزیل ترانسفراز
اولیگوساکارید غنی از مانوز
توالی لنگراندازی
تخریب مربوط به شبکه آندوپلاسمی
هدفمندسازی پروتئین
مارپیچ سه‌رشته کلاژن
تنظیم ترجمه
تداخل RNA
خاموش‌سازی RNA
کمپلکس خاموش‌سازی
القاءشونده توسط RNA
پروتئازوم
اوبی‌کوئیتین
قاعده انتهای N

1. Calpin



۷



DNA نوترکیبی و بیوتکنولوژی

ارتباطات بالینی

مفاهیم کلیدی

- از واکنش زنجیری پلیمراز (PCR) برای تعیین توالی‌های موجود در ژن‌ها، جایگاه‌های تنظیمی آنها و محصولات مربوطه استفاده می‌شود.
- آندونوکلئازهای محدودکننده (RE) تولید ملکول‌های DNAای برای سنتز ملکول‌های DNA نوترکیب می‌کنند. ملکول‌های DNA مربوط به دوگونه مختلف را می‌توان با یک RE تجزیه نمود تا ملکول‌های با دو انتهای تک- رشته مکمل حاصل شود که می‌توانند به یکدیگر متصل و دوخته شوند. در صورتی‌که یک گونه DNA به‌عنوان ناقل بوده و در یک باکتری یا سلول همانندسازی کند، نسخ متعدد DNA نوترکیب را می‌توان تولید نمود.
- کلون‌سازی یک سلول با یک ملکول نوترکیبی اختصاصی نیاز به تکنیک‌هایی جهت انتخاب یک باکتری یا سلول واحد حاوی DNA موردنظر و سپس همانندسازی این سلول جهت تولید سلول‌های دختری دارد که تمامی آنها حاوی یک DNA نوترکیب باشند.
- کتابخانه‌های ژنومیک با گروه بسیار بزرگ ملکول‌های DNA نوترکیبی تولید می‌شوند که حاوی قطعاتی از DNA یک ژنوم کامل متصل به یک ناقل هستند و به‌داخل باکتری‌ها یا سلول‌ها ترانسفرمه شده‌اند. کلون‌های اختصاصی را می‌توان انتخاب نمود.
- تکنیک‌های هیبریدیزاسیون اسیدنوکلئیک با پروب‌های DNA یا RNA نشاندار می‌توانند الگوهای DNA چندشکلی DNA ژنومی مربوط به افراد مختلف، گونه‌های RNA اختصاصی و کلون‌های سلولی حامل یک DNA نوترکیبی اختصاصی، را مورد جستجو قرار دهند.
- رونویسی معکوس از mRNA سلولی تولید cDNA می‌کند. یک کتابخانه cDNA شامل تمامی ملکول‌های cDNA حاصل از کل mRNA سلولی است.
- ناقلین مختلف را می‌توان با DNA خارجی دارای چندین هزار تا چند صدهزار جفت باز نوترکیب نمود. الحاق‌های DNAای کوچک می‌توانند نمایشی از cDNA یک ژن بیان شده باشند، در حالی‌که الحاق‌های بزرگتری برای حمل یک ژن ژنومی با اینترون و توالی‌های تنظیمی فرادست و فرودست مورد نیاز می‌باشد.
- ناقلین بیانی گونه‌هایی از DNA هستند که طوری با «ژن‌های» خارجی وظیفه‌دار ترکیب می‌شوند که وقتی به‌داخل یک باکتری یا سلول ارائه می‌گردند، «ژن» نوترکیب رونویسی و ترجمه می‌شود.
- جهش‌زایی هدایت‌شده- جایگاهی با DNA نوترکیب کلون‌شده می‌تواند منجر به حذف انتخابی یک نوکلئوتید شود. «ژن‌های» تغییریافته برای مطالعه ساختمان و عملکرد پروتئین کدشده مورد استفاده قرار می‌گیرند.
- تنظیم بیان ژن در حالات متابولیکی بیمار یا تغییریافته را می‌توان با فناوری‌های DNA نوترکیب، شامل فناوری‌های اسید نوکلئیک ضدمعنی، ارائه ژن‌های طبیعی برای ژن‌های تغییریافته، و تخریب ژن در حیوانات کامل (حیوانات ناتوان شده)، مورد مطالعه قرار داد.

۷-۱ • مقدمه

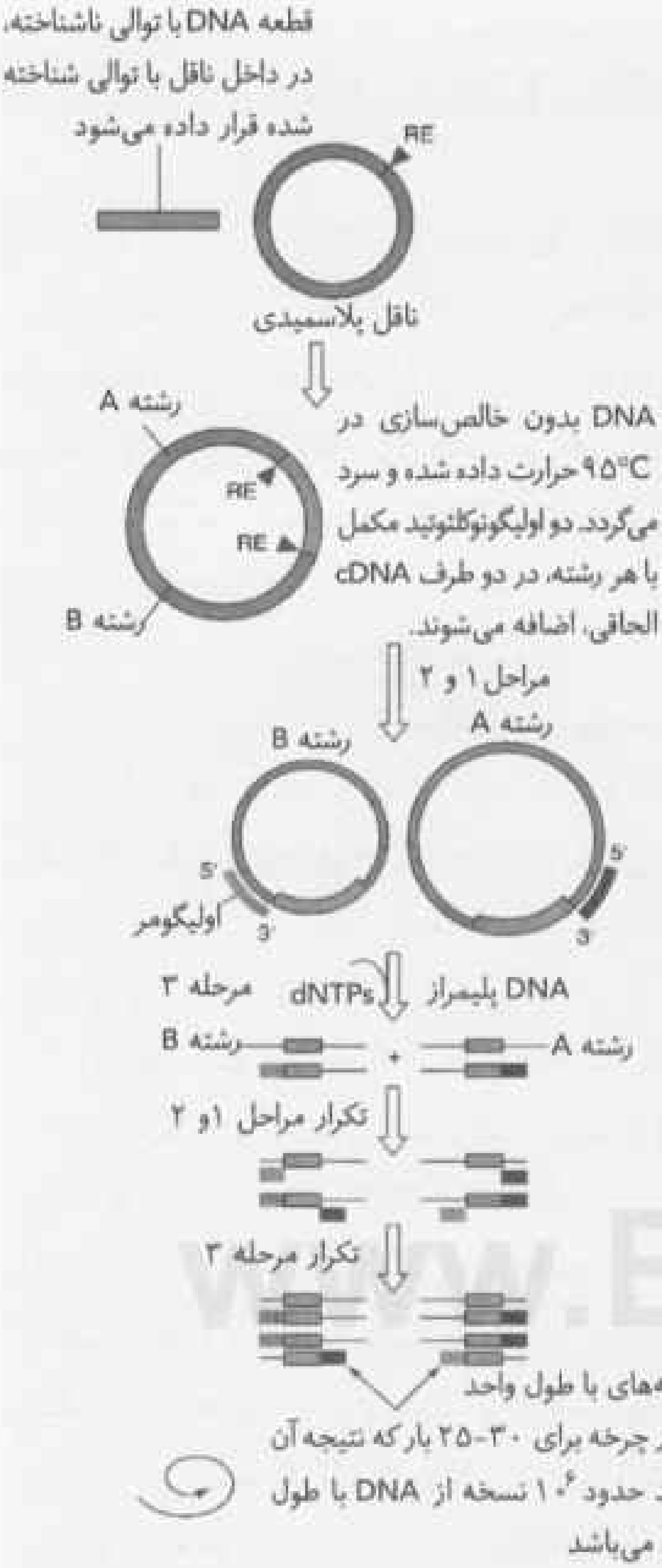
تا سال ۱۹۷۰، براساس مطالعات دانشمندان متعدد طی ۳۰ سال قبل از آن، صحنه برای بیولوژی ملکولی مدرن آماده شد. طی این مدت عدم شناخت از ماهیت بیوشیمیایی هماهنگ-کننده همانندسازی با صداقت اشکال مختلف حیات منتهی به وضعیتی شد که در آن امکان عادی‌سازی تعیین توالی و دستکاری بیان ژن‌ها فراهم گردید، از آن به بعد، حرکت سرسختانه پیشرونده به‌سمت شناخت کامل از تنظیم ژن تحت شرایط طبیعی و پاتولوژیک صورت گرفت. تعیین هویت، تخلیص، و تعیین خصوصیات آندونوکلئازهای محدودکننده، امکان ابداع روش‌های DNA نوترکیب را فراهم نمودند. با ابداع تعیین توالی DNA، رازهای موجود در داخل سازماندهی ژنوم‌های بیولوژیکی متنوع همراه با تعیین توالی کامل پروکاریوت‌ها و اوکاریوت‌های متعدد نظیر ژنوم انسان، آشکار شدند. بدیهی است توصیف تمام ژن‌های

انسانی و توالی‌های تنظیمی آنها به میزان زیادی شناخت ما از بیماری‌های ژنتیکی متعددی را افزایش خواهد داد. این دانش همراه با پیشرفت‌های فناوری حاصل در دستکاری ژن‌ها و بیان ژن، همچنین می‌بایست بزرگراه‌های جدیدی را به سمت کنترل و درمان این بیماری‌ها فراهم سازد. صدها کارآزمایی بالینی در ژن درمانی آغاز شده است که بیماران متعددی در آنها شرکت دارند. بیماری‌های ژنتیکی که هم اکنون شناخته شده‌اند و یا آنهایی که قرار است مورد شناسایی قرار گیرند، بعد از برداشت موانع سر راه، نهایتاً می‌بایست از طریق ژن درمانی با جایگزینی قابل معالجه شوند. وقتی به پیشرفت‌های متعدد بیولوژی ملکولی طی سه دهه گذشته نگاه می‌کنیم، منطقی است که اعتقاد داشته باشیم زمان آن زیاد دور نخواهد بود. چالش قدیمی که در مقابل دانشمندان قرار داشت، نحوه تعیین توالی ژنوم انسان بود؛ چالش جدید این است که چطور به شکل مؤثری این اطلاعات را دستکاری کنیم تا برای بشریت مفید باشد.

۷-۲ • واکنش زنجیری پلیمراز

تا قبل از سال ۱۹۸۷، آنالیز توالی و عملکرد یک ناحیه انتخاب‌شده DNA نیاز به مقادیر نسبتاً زیاد قطعه DNA خالص‌شده داشت. با ابداع **واکنش زنجیری پلیمراز**[1] **(PCR)** قدم بزرگی در جهت تولید سریع مقادیر زیاد یک توالی DNA اختصاصی برداشته شد. برای این منظور نیاز به دو اولیگومر نوکلئوتیدی وجود دارد که با رشته‌های DNA مکمل در ناحیه مورد نظر هیبرید می‌شوند. این اولیگومرها به‌عنوان پرایمر برای DNA پلیمرازی عمل می‌کنند که هر کدام از این رشته‌ها را امتداد می‌دهد. با تکرار چرخه PCR، مقادیر زیادی از هر ملکول DNA مورد نظر طی چند ساعت، در مقابل چند روز تا چند هفته در تکنیک‌های کلون‌سازی، به دست می‌آید.

ازدیاد یک توالی اختصاصی DNA توسط PCR با DNA خالص‌شده یا مخلوط پیچیده‌ای از DNA انجام می‌شود. اصول واکنش در شکل ۱-۷ نشان داده شده است. توالی اولیگونوکلئوتیدی DNAای که قرار است تکثیر داده شود، می‌بایست شناخته‌شده باشد، و یا لازم است در یک ناقل کلون شود (ص ۳۷۷) که برای آن توالی DNA پهلویی مشخص شده است. محصول PCR یک DNA دو-رشته[2] (dsDNA) است و واکنش در هر دور، زمانی تکمیل می‌شود که تمامی ملکول‌های الگو نسخه‌برداری شده باشند. برای شروع دور جدید همانندسازی، نمونه گرم شده تا dsDNA ذوب (به دو تک‌رشته تبدیل) شود، در حضور مقادیر مازاد پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی سرد (متصل) می‌گردند تا امکان هیبریدیزاسیون الگوی تک-رشته با اولیگومرهای آزاد فراهم شود. همانندسازی DNA در حضور DNA پلیمراز و تمامی چهار dNTPs آغاز می‌شود. برای ذوب‌نمودن DNA نیاز به حرارت تا 95°C می‌باشد که اکثر DNA پلیمرازها را غیرفعال می‌کند؛ هر چند هم



شکل ۱-۷ واکنش زنجیری پلیمراز (PCR). یک قطعه DNA با توالی ناشناخته به طریق فناوری نوترکیبی در داخل ناقلی با توالی شناخته‌شده قرار داده می‌شود. نیازی به تخلیص DNA نوترکیب موردنظر نیست. این DNA تا 95°C حرارت داده می‌شود تا دو رشته از یکدیگر جدا و در حضور مقادیر مازاد دو اولیگومر مکمل مختلف که با توالی‌های DNA ناقل شناخته‌شده موجود در طرفین DNA خارجی هیبرید شود. تنها گونه‌های DNA تک-رشته‌ای می‌توانند به‌عنوان الگو برای همانندسازی DNA عمل و تولید قطعات DNA دو-رشته از DNA خارجی کنند که توسط توالی‌های DNA اولیگومری احاطه شده باشند. چرخه حرارت دادن-همانندسازی به دفعات زیادی تکرار شده تا سریعاً تولید مقادیر زیادی DNA خارجی ابتدایی شود. قطعه DNA مورد نظر را می‌توان به طریق شکستن آن با آندونوکلئاز محدودکننده (RE) ابتدایی، الکتروفورز مخلوط DNA در میان یک ژل آگارز، و الوت باند مورد نظر از ژل، از مخلوط PCR تخلیص نمود.

1. Polymerase chain reaction 2. Double-stranded DNA

اکنـون از یک پلیمراز مقـاوم به حـرارت جداشده از *Thermus aquaticus*، تحت عنـوان DNA پلیمراز Taq، استفاده می‌شود که نیاز به افزودن پلیمراز تازه بعد از هر دور را برطرف می‌کند. این موضوع شرایط را برای خودکارسازی PCR فراهم نموده است که طی آن هر ملکول DNA می‌تواند یک میلیون برابر ازدیاد یابد.

یک DNA پلیـمراز مقاوم به حـرارت بی‌همتـا، یعنی DNA پلیـمراز صداقت- بـالا Phusion™، به‌شکل تجارتی برای کاربردهای معمول و پردرخواست PCR ابداع شده است. این آنزیم با ادغام یک دومن اتصال به dsDNA بی‌همتا به یک پلیمراز غلط‌گیری *pyrococcus*-مانند ساخته شده است. پیشروندگی این آنزیم ادغامی تقریباً دو برابر DNA پلیمراز Taq است و خطای آن ۵۰ برابر کمتر می‌باشد. همچنین، برخلاف DNA پلیمراز Taq، این آنزیم توسط هیچ میزانی از خون مهار نمی‌شود. لذا DNA ژنومی را می‌توان مستقیماً از قطرات خون، بدون نیاز به مراحل گران و زمان‌گیر تخلیص مورد نیاز با آنزیم Taq، تکثیر نمود.

PCR لانه‌ای

وقتی DNAای که قرار است تکثیر داده شود، در مقایسه با میزان کل DNA موجود در نمونه، غلظت بسیار پایینی دارد، ناحیه DNA موردنظر را می‌توان همراه با سایر توالی‌های اضافی دیگر تکثیر نمود. در این حالت، ویژگی تکثیر را می‌توان به طریق PCR لانه‌ای[1] افزایش داد. بعد از انجام اولین PCR با یک مجموعه پرایمر برای ۱۰ تا ۲۰ دور، نمونه کوچکی برای PCR دوم برداشت می‌شود. هرچند، این PCR با استفاده از پرایمرهایی انجام می‌شود که **مکمل** DNA الگویی هستند که درست در فرودست اولین پرایمرها قرار دارند و یا بین مجموعه ابتدایی پرایمرها «لانه» کرده است. با این فرایند، ناحیه DNA مورد نظر دو بار با یک افزایش قابل‌توجه در ویژگی تکثیر داده می‌شود. PCR کاربردهای زیادی در تشخیص ژنی، بررسی‌های مربوط به پزشکی قانونی که برای آن فقط یک قطره از خون خشک‌شده یا یک مو وجود دارد؛ و مطالعات محیطی بر روی مواد بیولوژیکی حفظ شده دارد (ارتباط بالینی ۱-۷). در سال ۲۰۰۸ یک فناوری جدید، DNA/PCR لمسی[2] برای روشن‌سازی نقش والدین در قتل دختر جوان خود، جان بِنِت رامسی[3]، بکار گرفته شد. این روش می‌تواند از یک یا چند سلول متصل به هر سطحی به عنوان منبع کافی DNA برای تکثیر به طریق PCR یا آنالیز با انگشت‌نگاری DNA مورد استفاده قرار گیرد که توسط یک فرد لمس شده است (در این مورد، شلوار جان بِنِت که توسط قاتلین لمس شده بود). بعد از بیش از یک دهه ابهام، بالاخره نتایج نقش والدین را در این مورد هولناک و شدیداً همگانی‌شده را نشان دادند.

1. Nested PCR 2. Touch DNA/PCR 3. Jon Benet Ramsey

ارتباط بالینی ۱-۷

واکنش زنجیری پلیمراز

الف) PCR در غربالگری ویروس نقص ایمنی انسان

استفاده از PCR در ازدیاد مقادیر کم DNA تحولی را در جستجو و آنالیز انواع DNA به وجود آورده است. با استفاده از PCR سنتز DNA کافی برای آنالیز ممکن می‌باشد. جستجو و شناسایی متداول ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)، برای مثال به طریق هیبریدیزاسیون DNA-لکه ساترن و آنالیز آنتی‌ژن، کار پرزحمت و پرهزینه‌ای است که حساسیت پایینی دارد. یک فرد مبتلا، بدون علامت ایدز (سندروم نقص ایمنی اکتسابی)، ممکن است با این روش‌ها نتیجه منفی کاذب داشته باشد. جستجوی زودرس عفونت‌های HIV برای شروع درمان با پایش پیشرفت بیماری اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. به علاوه، یک روش حساس برای تضمین بررسی اطمینان از نبود HIV در خون اهداءکننده‌ها مورد نیاز است. ازدیاد توالی‌های HIV DNA بالقوه در داخل DNA جداشده از گلبول‌های سفید خون یک فرد به طریق PCR، امکان جستجوی عفونت قبل از ظهور آنتی‌بادی‌ها، یاحالت سرم-منفی، را فراهم می‌سازد. با پیدایش درمان‌های ترکیبی ضدویروسی (مهار-کننده‌های پروتئاز) جدید برای HIV، پتانسیل جهش‌های ویروسی منتهی به مقاومت دارویی کاهش یافته است. هرچند، برخی بیماران مقاومت چند دارویی را نشان می‌دهند. یک جهش معمول ژنوم ویروسی، L9OM، منتهی به مقاومت نسبت به مهارکننده پروتئاز می‌گردد. با استفاده از PCR اختصاصی آلل L09M، ناحیه ویروسی gag-pro در نمونه‌های مربوط به مراحل ابتدایی بیماری در ۱۵ بیمار ازدیاد و تعیین توالی شد. سپس نتایج با نتایج حاصل از نمونه‌هایی مقایسه شد که بعد از مقاومت به درمان دارویی از بیماران گرفته شده بودند. ویروس‌های L9OM میزان حداقلی از کل ویروس‌ها در نمونه‌های ابتدایی را شامل می‌شدند. هرچند، این گونه‌های جهش‌یافته به گونه‌های غالب در پلاسمای بیماران مقاوم به دارو تبدیل شده بودند. همان‌طور که با آنالیز تکاملی بیسین[1] تعیین شد، به نظر می‌رسد که ظهور ویروس‌های حاوی L9OM غالب در مواقع متعددی در بسیاری از بیماران رخ می‌دهد. جستجوی زودرس تبدیل ویروس‌های حساس به دارو به مقاوم به دارو با آنالیز PCR می‌تواند کمک زیادی در درمان بالینی این بیماران داشته باشد.

ب) PCT لانه‌ای جهت جستجوی میکروکایمریسم

نشان داده شده است که لکوسیت‌های دهنده انتقالی به بیماران طی انتقال خون در خون محیطی زنده پذیرنده‌ها می‌مانند. اهمیت، هرچه باشد، این جمعیت میکروکایمریکل لکوسیت‌ها هنوز مشخص نشده است. یکی از بهترین راه‌ها برای جستجوی سلول‌های مشتق‌شده از دهنده در خون پذیرنده، جستجوی چندشکلی‌ها در ناحیه HLA-DR کمپلکس سازگار نسجی اصلی (MHC) به طریق PCR است. یک آزمون PCR لانه‌ای حداقل ۱۰۰ برابر حساس‌تر از یک آزمون PCR استاندارد است. هرچند، به دلیل افزایش حساسیت، محصولات غیراختصاصی ممکن است به دلیل حوادث غلط پرایمینگ ظاهر شوند که عموماً همراه با ژن‌های کاذب هستند. به همین دلیل لازم است یک الگوی پایه از نمونه‌های خون قبل از انتقال خون تعیین شود. وقتی مثبت‌های کاذب بالقوه از این الگوهای پایه حذف شوند، آنگاه جستجوی لکوسیت‌های دهنده به میزان زیادی افزایش خواهد یافت.

1. Bayesian evolutionary analysis

PCR زمان- واقعی کمّی

PCR زمان- واقعی کمّی[1] **(qRT-PCR)** واکنش ازدیاد PCR سنتی را با تعیین مقدار کمّی همزمان DNA سنتزشده بعد از هر دور، جفت می‌کند. با این تکنیک فرد می‌تواند تعداد نسخه‌های یک توالی DNA را در داخل یک ژنوم محاسبه کند. همچنین با شروع واکنش با RT-PCR[2] (PCR- ترانس‌کریپتاز معکوس) که تولید cDNA به عنوان الگوی PCR عمل می‌کند، از این روش می‌توان برای تعیین میزان نسبی بیان یک ژن در یک سلول استفاده نمود. در هر کدام از این موارد لازم است کمّیت محصول DNA با یک ژن خانه‌دار

1. Quatitative real-time PCR 2. Rverse transcriptase-PCR

داخلی مقایسه شود که بیان آن تقریباً در تمامی سلول‌های مورد مطالعه برابر است. در حال حاضر انواع مختلفی از این تکنیک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که برخی از آنها نسبت به بقیه در کمّیت محاسبه‌شده دقیق‌تر هستند، ولی در اینجا فقط فرایند ساده آن شرح داده می‌شود.

با وجود اینکه RT-PCR/PCR معمولاً از **پرایمرهای پیشرو**[1] و **معکوس**[2] استفاده می‌کند که محصولات DNA در دامنه bp ۶۰۰-۳۰۰ را به‌وجود می‌آورند، qRT-PCR در بیشتر مواقع از پرایمرهایی استفاده می‌کند که فقط حدود ۱۰۰ جفت باز از یکدیگر فاصله دارند. روش شرح داده شده در اینجا از این واقعیت بهره می‌برد که کروموفلور، SYBR سبز، فقط به یک DNA دو-رشته و نه DNA تک-رشته اتصال می‌یابد. وقتی این کروموفلور به یک DNA دو-رشته اتصال می‌یابد، با درخشندگی بسیار بیشتری نسبت به حالت آزاد، فلورسانس دارد. DNA از الگوهای DNA یا cDNA در حضور SYBR سبز در یک دستگاه PCR تکثیر داده می‌شود که فلورسانس کمپلکس SYBR-DNA سبز را بعد از هر دور اندازه‌گیری می‌کند. لذا افزایش در فلورسانس هر دور متناسب با سنتز زمان واقعی DNA ازدیادیافته می‌باشد. نمودار لگاریتم واحدهای فلورسانس در مقابل تعداد چرخه، یک ارتباط خطی طی فاز تکثیر لگاریتمی PCR را نشان می‌دهد. قسمت خطی منحنی با استاندارد شناخته شده داخلی ژن خانه‌دار جهت تعیین کمّیت محصول DNA/cDNA مقایسه می‌شود. این تکنیک برای تعیین بیان تمایزی ژن‌های اختصاصی در بافت‌های طبیعی نسبت به بافت‌های بیمار مورد استفاده قرار می‌گیرد که در آنها محصول ژنی ممکن است نقشی در نمو سلول‌های غیرطبیعی داشته باشد (ارتباط بالینی ۲-۷).

> **ارتباط بالینی ۲-۷**
>
> **PCR زمان-واقعی کمّی (qRT-PCR) در آنالیز ژن مرتبط با سرطان پروستات**
>
> سرطان پروستات بدخیمی غالب موجود در مردان آمریکای شمالی است. وقتی سرطان پروستات متاستاز می‌دهد، دیگر علاج شناخته‌شده‌ای برای آن وجود ندارد. لذا بسیار مهم است که بیومارکرهایی مورد شناسایی قرار گیرند که با بیماری متاستاتیک ارتباط دارند و یا ممکن است به‌عنوان اهداف درمانی جدید عمل کنند. دو رده سلولی از یک بیمار مبتلا به سرطان تولید شد که وقتی به موش‌های دچار نقص ایمنی پیوند شدند، پتانسیل متاستاتیک را داشتند یا غیرمتاستاتیک بودند. آنالیز تمایزی ژن‌های بیان‌شده در این دو رده سلولی، وجود یک ژن، ASAP1، را در رده سلول متاستاتیک نشان داد که قبلاً مرتبط با فرایند متاستاتیک در سرطان پروستات نبود. qRT-PCR تأیید نمود که ASAP1 (یک پروتئین فعال‌کننده GTPase فاکتور ADP-ریبوزیلاسیون راکد می‌کند) در رده سلول متاستاتیک تنظیم-افزایشی دارد. به‌علاوه، شروع بیان ASAP1 در سلول‌های سرطان پروستات از طریق RNA مداخله‌گر (siRNA؛ صفحه ۲۷۹ را ببینید) به میزان زیادی پتانسیل متاستاتیک این سلول‌ها را در آنالیز داخل-آزمایشگاه کاهش می‌دهد. این ژن ممکن است هدف مهمی برای درمان بالینی سرطان متاستاتیک پروستات باشد.

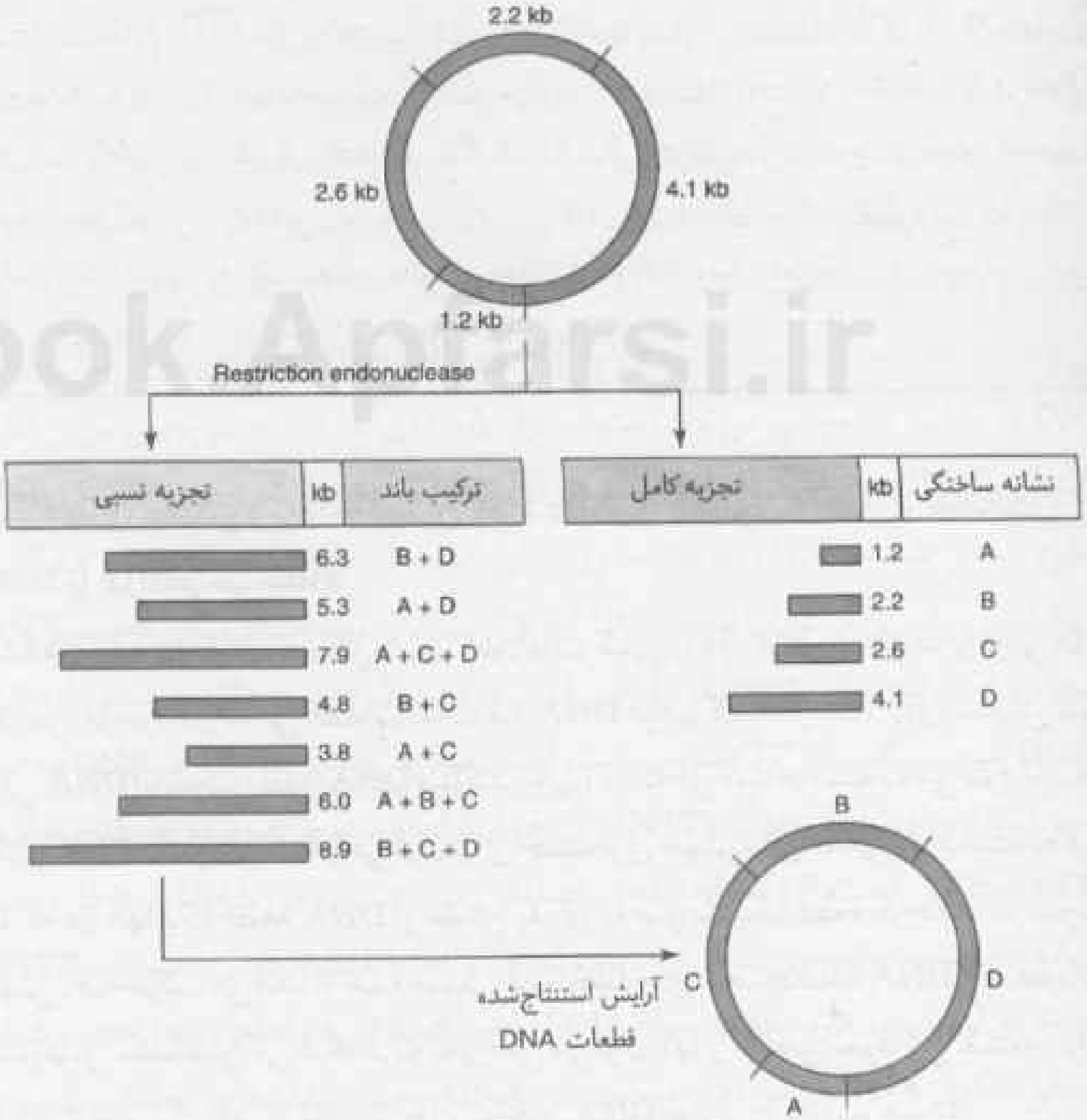
۳-۷ • آندونوکلئاز محدودکننده، نقشه‌های محدودکننده و تعیین توالی DNA

آندونوکلئازهای محدودکننده به‌طور انتخابی DNA را هیدرولیز می‌کنند

آندونوکلئازهای محدودکننده[3] قادر به بریدن انتخابی ملکول‌های DNA با اندازه‌ها و منابع متعدد به قطعات کوچکتر هستند. این آنزیم‌ها تا حدودی سبب حفاظت باکتری‌ها در برابر ویروس‌های (باکتریوفاژهای) مهاجم می‌شوند. توالی‌های DNA باکتریایی که به‌طور طبیعی توسط یک آندونوکلئاز محدودکننده مورد شناسایی قرار می‌گیرند، با متیلاسیون بازها در داخل این توالی‌های پالیندرومی، از تجزیه در سلول‌های میزبان محافظت می‌شوند. DNA ویروسی غیرمتیله به عنوان خارجی شناسایی و هیدرولیز می‌گردد. هم اکنون آندونوکلئازهای محدودکننده نوع II به‌طور تجارتی در دسترس قرار دارند (برای بحث پیرامون آندونوکلئازهای محدوکننده به صفحه ۸۰ مراجعه کنید).

1. Forward 2. Reverse 3. Restriction endonucleases

آندونوکلئازهای محدودکننده امکان ساختن یک **نقشه محدودکننده** را فراهم می‌سازند که در آن محل‌های شکست در داخل DNA شناسایی می‌شود. گونه‌های خالص‌شده DNA که حاوی توالی‌های حساس هستند، در معرض تجزیه توسط آندونوکلئاز محدودکننده قرار داده می‌شوند. با تنظیم زمان تماس DNA خالص‌شده برای تجزیه، جمعیتی از قطعات DNA با اندازه‌های مختلف تولید می‌شوند. جداسازی این قطعات با الکتروفورز بر روی ژل آگارز امکان ساختن یک نقشه محدودکننده را فراهم می‌سازد؛ یک مثال در شکل ۲-۷ آورده شده است. با استفاده متوالی از آندونوکلئازهای محدودکننده مختلف می‌توان یک نقشه محدودکننده با جزئیات از گونه‌های DNA حلقوی متعدد، شامل DNA مربوط به پلاسمیدهای باکتریایی، ویروس‌ها، و میتوکندری‌ها، تهیه نمود. به میزان برابر، از این روش می‌توان برای قطعات DNA خطی استفاده کرد که تخلیص و یکدست شده‌اند.



شکل ۲-۷ نقشه‌برداری آندونوکلئاز محدودکننده DNA. DNA خالص‌شده برای زمان‌های مختلف در معرض هضم توسط آندونوکلئاز محدودکننده قرار می‌گیرد تا قطعات DNA با هضم نسبی تا کامل تولید شوند. این قطعات توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز جدا و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی می‌شوند. با استفاده از منبع نور UV این باندها را می‌توان مشاهده و از آنها فتوگراف تهیه نمود. اندازه قطعات براساس حرکت نسبی آنها در میان ژل، در مقایسه با الکتروفورز همزمان رشته‌های DNA، تعیین می‌شود. آرایش نسبی هر قطعه موجود در داخل ملکول DNA را می‌توان از اندازه قطعات با هیدرولیز ناقص استنتاج نمود.

ارتباط بالینی ۳-۷

نقشه‌برداری محدودکننده و تکامل

در گذشته، مطالعات تکاملی گونه‌ها تنها وابسته به تغییرات آناتومیکی مشاهده‌شده در ثبت‌های فسیلی و تعیین تاریخ کربنی بود. آنالیز ملکولی توالی و اندازه ژن‌های انتخابی یا کل ملکول‌های DNA از این مطالعات حمایت می‌کنند. تغییراتی در یک ملکول DNA انتخابی از گونه‌های مختلف را می‌توان سریعاً با نقشه‌برداری محدودکننده ارزیابی نمود که نیاز به یک فرآورده خالص DNA دارد. میتوکندری‌های پستانداران یک ملکول DNA حلقوی بسته با bp ۱۶ ۵۶۹ دارند که می‌توان آن را سریعاً از سلول‌ها تخلیص نمود. این DNA میتوکندریایی (mtDNA) را می‌توان بدون نیاز به کلون‌سازی یک ژن اختصاصی، مستقیماً برای مطالعه تغییرات تکاملی در DNA به‌کار برد.

mtDNA از میمون گینه، میمون رزوس، میمون guenon و انسان جدا و با ۱۱ آندونوکلئاز محدودکننده مختلف شکسته شده است. نقشه‌های محدودکننده نسبت به جهت و جایگاه نوکلئوتیدی که از آن همانندسازی DNA آغاز می‌شود، صف‌بندی شدند. مقایسه جایگاه‌های آندونوکلئاز محدودکننده امکان محاسبه شدت واگرایی در توالی نوکلئوتیدی بین این گونه‌ها را فراهم نمود. میزان جایگزینی بازی (محاسبه‌شده براساس شدت واگرایی در مقابل زمان واگرایی) حدود ۱۰ برابر بیشتر از ژنوم هسته‌ای است. این میزان بالای جهش ملکول mtDNAای که به‌راحتی تخلیص می‌شود، آن را به یک مدل فوق‌العاده برای مطالعه ارتباطات تکاملی بین گونه‌ها تبدیل نموده است.

آنالیز mtDNA را می‌توان برای مطالعه الگوهای مهاجرت مردمی استفاده نمود که در نواحی جغرافیایی مختلفی ساکن هستند، ولی الگوهای حاصل از آنزیم محدودکننده (چندشکلی طول قطعه محدودکننده [RFLP]) آنها یکی است. بومیان آمریکا براساس الگوهای محدودکننده mtDNA خود به چهار هالوگروپ اصلی تقسیم می‌شوند. معتقدند اجداد این گروه‌ها از مردم Clovis (Paleoindian) می‌باشند که درست قبل از دوره یخبندان اصلی از آسیا و سیبری مهاجرت نموده و وارد آمریکای شمالی شده‌اند. تعیین زمان این مهاجرت از مطالعه‌ای به مطالعه دیگر کاملاً متفاوت است. هرچند، به نظر می‌رسد آنالیز mtDNA، ازدیادیافته از مدفوع‌های فسیلی (مدفوع سنگ‌شده انسان) اورگان، می‌تواند شکل‌گیری جمعیت انسانی آمریکایی را قبل از مردم Clovis اثبات کند. توالی‌های mtDNA نشان‌دهنده هالوگروپ‌های A2 و B2 بومیان آمریکایی و نمونه‌های قبل از Clovis، حداقل ۱۰۰۰ سال می‌مانند.

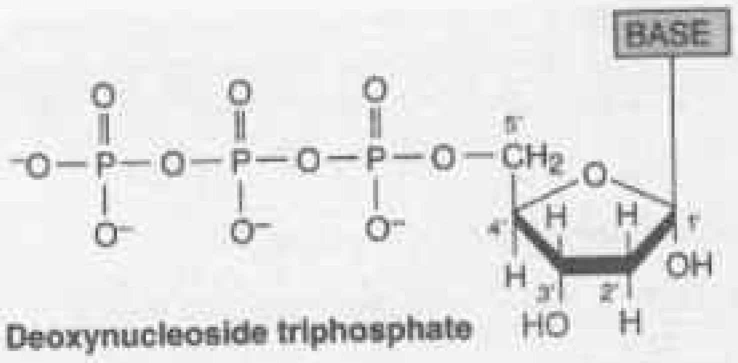
نقشه‌های محدودکننده امکان آماده‌سازی معمول قطعات مشخص DNA را فراهم می‌سازد

نقشه‌های محدودکننده ممکن است اطلاعات کمّی را در خصوص ژن‌ها یا توالی‌های تنظیمی موجود در داخل قطعات مختلف DNA فراهم کنند. از اینها برای نمایش تنوع توالی DNA اندامکی، نظیر DNA میتوکندریایی، در داخل گونه‌ها استفاده می‌شود (ارتباط بالینی ۳-۷). همچنین آنها را می‌توان برای جستجوی جهش‌های حذفی مورد استفاده قرار داد که در آنها یک قطعه DNA از سوش پدری به صورت یک قطعه کوچکتر در سوش جهش‌یافته حرکت می‌کند. از همه مهم‌تر، آندونوکلئازهای محدودکننده DNA را به قطعات هُموژنوس مشخصی می‌شکنند که به راحتی می‌توان آنها را خالص نمود. این نقشه‌ها برای کلون‌سازی و برای تعیین توالی ژن‌ها و نواحی DNA پهلویی آنها مهم هستند.

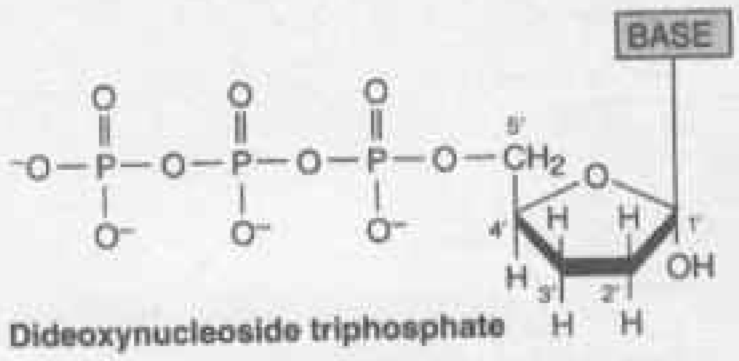
روش شکست آنزیمی منقطع: روش سَنگر

در اواخر دهه ۱۹۷۰ دو تکنیک تعیین‌توالی مختلف ابداع شد: یکی توسط ماکسام و ژیلبرت[1] به عنوان رهیافت تجزیه-شیمیایی، و دیگری توسط سَنگر[2] تحت عنوان رهیافت

1. A. Maxam and D. Gilber 2. F. Sanger



Deoxynucleoside triphosphate



Dideoxynucleoside triphosphate

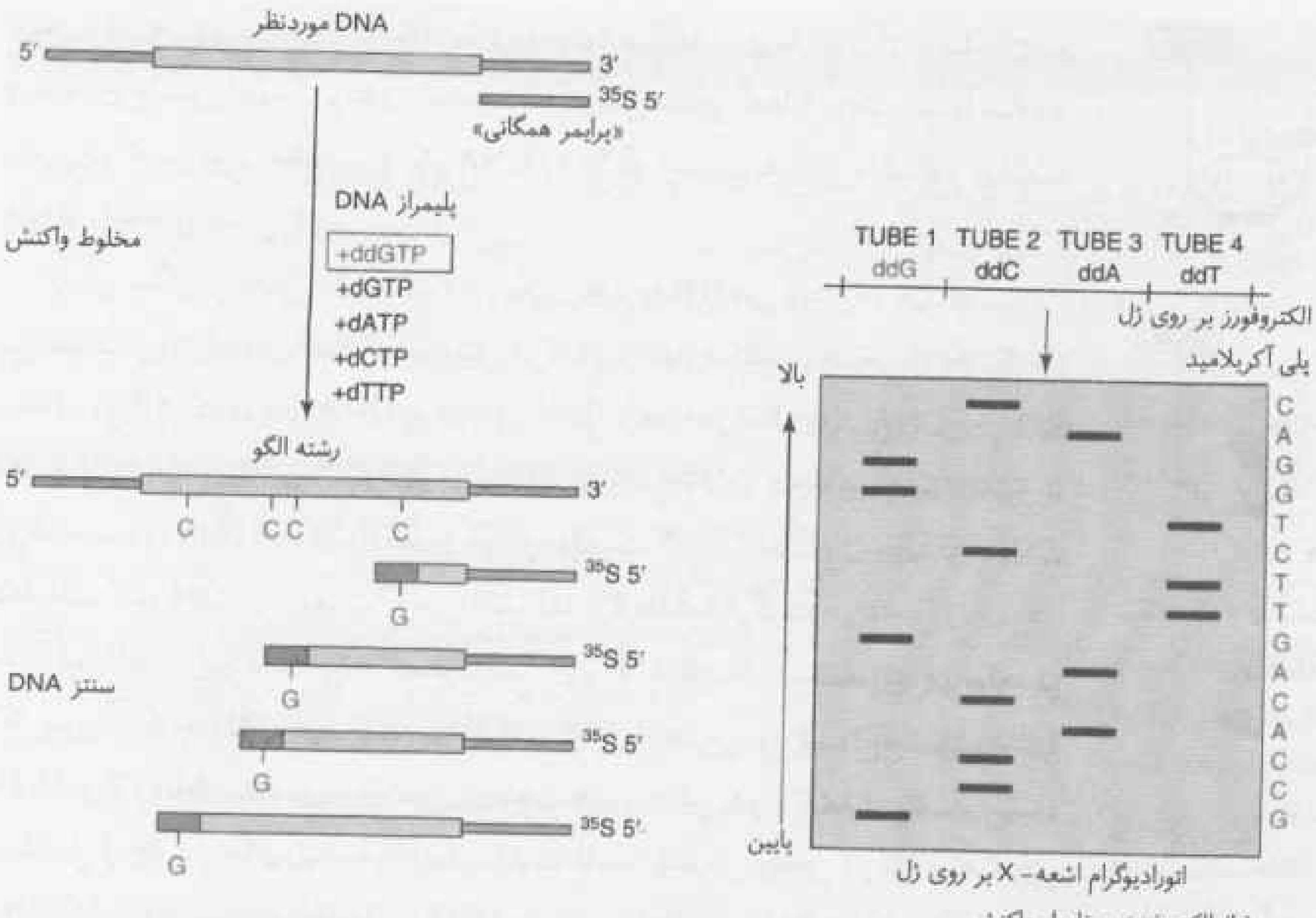
شکل ۳-۷ ساختمان داکسی‌ریبونوکلئوزید تری‌فسفات و دی‌داکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات. گروه ۳′- هیدروکسیل در جزء ریبوزی دی‌داکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات (ddNTP) وجود ندارد. این ملکول می‌تواند با یک پیوند فسفودی استری از طریق ۵′- فسفات خود در داخل یک ملکول در حال رشد DNA قرار داده شود. بعد از این قرارگیری، به‌دلیل نداشتن گروه پذیرنده ۳′- هیدروکسیل برای نوکلئوتید بعدی، ddNTP ادامه سنتز را متوقف می‌سازد.

آنزیمی. در هر دو روش از نشاندارسازی نوکلئوتید انتهایی و به‌دنبال آن جداسازی و جستجوی اولیگونوکلئوتید تولیدی استفاده شد. روش سَنگِر به‌دلیل روش نسبتاً ساده و توانایی در تعیین توالی قطعات بلندتر DNA (۴۰۰ باز) نسبت به روش ماگسام و ژیلبرت، به روش انتخابی تبدیل شد.

روش **سِنگِر** براساس خاتمه تصادفی یک زنجیر DNA طی سنتز آنزیمی است. در این تکنیک از آنالوگ دی‌داکسی‌نوکلئوتیدی هر کدام از چهار نوکلئوتید طبیعی (شکل ۳-۷) استفاده می‌گردد که توسط DNA پلیمراز در داخل زنجیر در حال رشد DNA قرار داده شده و ادامه طویل‌سازی را متوقف می‌سازد. ریبوز موجود در **دی‌داکسی‌ریبونوکلئوزید تری‌فسفات (ddNTP)** فاقد گروه OH در هر دو موقعیت ۲′ و ۳′ است، در حالی‌که dNTP فقط فاقد گروه OH در موقعیت ۲′ می‌باشد. لذا ddNTP قرار گرفته در داخل زنجیر در حال رشد قادر به ایجاد یک پیوند فسفودی‌استری با dNTP دیگر نیست، زیرا در موقعیت ۳′ ریبوز آن گروه OH وجود ندارد. با افزودن dNTP طبیعی و ddNTP (برای مثال، dATP و ddATP) به سیستم واکنش با غلظت‌هایی که این دو نوکلئوتید برای قرارگیری در داخل زنجیر در حال رشد با یکدیگر رقابت کنند، رشد این زنجیر در نقاط تصادفی متوقف می‌شود. شناسایی قطعات DNA نیاز به نشاندارسازی انتهای ۵′ ملکول‌های DNA یا قرار دادن نوکلئوتیدهای نشاندار در طی سنتز دارد. این تکنیک که در شکل ۴-۷ شرح داده شده است، به بهترین شکل با DNA رشته خالص انجام می‌شود؛ هر چند، از DNA دو-رشته دناتوره نیز می‌توان استفاده کرد. DNAای که قرار است تعیین توالی شود، اغلب از یک باکتریوفاژ تک-رشته نوترکیب (ص ۳۷۵) جدا می‌شود که در آن یک ناحیه موجود در دو طرف DNA مورد نظر حاوی توالی است که مکمل با یک پرایمر همگانی می‌باشد. این پرایمر را می‌توان با نوکلئوتید ^{32}P یا ^{35}S نشاندار نمود. امتداد با یکی از چند DNA پلیمراز متعدد انجام می‌شود؛ یکی از این آنزیم‌ها که فراگیری زیاد دارد به طریق ژنتیکی از DNA پلیمراز باکتریوفاژ T7 مهندسی شده است. مخلوط واکنش متشکل از DNA هدف، پرایمر نشاندار، و تمامی چهار dNTPs، در چهار لوله تقسیم می‌شود که هر کدام حاوی ddNTP متفاوتی است. ddNTPها به‌طور تصادفی طی سنتز آنزیمی DNA در داخل زنجیر قرار گرفته و سبب خاتمه می‌شوند. از آنجایی‌که ddNTP با غلظت پایینی نسبت به dNTP مربوطه در لوله وجود دارد، خاتمه سنتز DNA به‌طور تصادفی در تمامی محل‌های مکمل احتمالی الگوی DNA رخ می‌دهد. ملکول‌های DNA حاصل، اندازه‌های مختلفی دارند و در انتهای ۵′ نشاندار هستند که می‌توان آنها با الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید جدا نمود. گونه‌های نشاندار با اتورادیوگرافی اشعه-X آشکار شده و توالی خوانده می‌شود.

در ابتدا، این روش نیاز به یک الگوی DNA تک-رشته، تولید یک پرایمر اولیگو-نوکلئوتیدی مکمل اختصاصی، و یک فرآورده نسبتاً خالص قطعه کلِنو[1] از DNA پلیمراز

1. Klenow fragment



(a) باکتریوفاژ M13 نوترکیب

(b) الکتروفورز مخلوط واکنش بر روی ژل پلی‌آکریلامید

شکل ۴-۷ روش دی‌داکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات سَنگر برای تعیین توالی DNA. ناحیه DNA موردنظر در داخل ملکول DNA باکتریوفاژ قرار داده می‌شود. باکتریوفاژ در حال همانندسازی تولید یک ملکول DNA نوترکیب تک-رشته می‌کند که به‌راحتی تخلیص می‌شود. توالی شناخته‌شده DNA باکتریوفاژی موجود در فرودست این الحاق DNA به عنوان یک جایگاه هیبریدیزاسیون برای یک اولیگومر با انتهای نشاندار با یک توالی مکمل، یک پرایمر همگانی، عمل می‌کند. امتداد این پرایمر توسط یک DNA پلیمراز و تمامی چهار dNTP به همراه یک ddNTP، برای مثال ddGTP، کاتالیز می‌شود. وقتی ddNTP در داخل ملکول در حال رشد قرار داده می‌شود، سنتز متوقف می‌گردد. توجه داشته باشید که ddNTP برای قرارگیری با dNTP رقابت می‌کند. نتیجه تولید قطعات DNA با هر طول ممکن می‌باشد که انتهای آنها نشاندار بوده و به طریق الکتروفورز جدا می‌شوند. سپس توالی DNA را می‌توان براساس الگوهای الکتروفورتیک تعیین نمود.

I باکتری *E.coli* داشت. این مشکلات برطرف شده‌اند و با ایجاد تغییراتی، روش ساده شده است.

روش‌های PCR و **سَنگر** برای تعیین توالی مستقیم نواحی DNA کوچک مورد نظر جفت شده‌اند. محصول دو - رشته PCR مستقیماً به عنوان الگو انتخاب می‌شود. شرایط طوری تنظیم می‌شود که یک رشته از DNA ذوب‌شده (الگو)، در مقایسه با سردشدن با رشته مکمل، ترجیحاً با پرایمر سرد شود. سپس تعیین توالی طبق واکنش خاتمه زنجیر دی‌داکسی استاندارد (به‌طورشاخص با جایگزینی پلیمراز کِلِنو با Sequanase) انجام می‌شود که طی آن سنتز زنجیرهای با طول‌های مختلف با امتداد پرایمر PCR رخ می‌دهد. این روش به‌شکل موفقیت‌آمیزی برای تشخیص ناهنجاری‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (ارتباط بالینی ۴-۷).

تعیین‌توالی خاتمه‌دهنده - رنگی

ابداع روش تعیین توالی خاتمه‌دهنده - رنگی[1] به میزان زیادی تعیین توالی DNA را ساده، سریع و کم هزینه کرده است. از اصول پایه روش آنزیمی سَنگِر استفاده می‌شود؛ هرچند، هر ddNTP با یک فلور رنگی متفاوت به‌طریق فلورسنت نشاندار می‌گردد. از آنجایی که هر ddNTP رنگی که واکنش را خاتمه می‌دهد، اولیگونوکلئوتیدهایی با رنگ فلورسنت متفاوت تولید می‌کند، نیازی به انجام واکنش‌ها در چهار لوله نمی‌باشد. فقط یک واکنش انجام می‌شود که در آن محصولات با الکتروفورز موئینه‌ای جدا و در یک سکوانسر (تعیین توالی‌کننده) DNA خودکار با راندمان بالا تعیین توالی می‌شوند. نمونه اسکن‌شده‌ای از یک کروماتوگرام و توالی حاصل از آن در شکل ۵-۷ نشان داده شده است.

روش تعیین توالی خاتمه‌دهنده -رنگی، همانند روش سَنگِر، قادر به تعیین توالی حدود ۴۰۰ نوکلئوتید در هر زمان است. روش‌های جدید در حال تکوین و اکتشاف هستند که به‌میزان زیادی هزینه را کاهش داده و به‌طور همزمان به میزان زیادی اندازه زنجیرهای DNA تعیین‌توالی شونده را افزایش می‌دهند. هدف نهایی این روش‌های بهبودیافته، توانایی در تعیین توالی سریع کل ژنوم افراد به قیمت کمتر از ۱۰۰۰ دلار می‌باشد. با رسیدن به این هدف، پزشکان و دانشمندان این امکان را پیدا می‌کنند تا بین ژن‌های جهش‌یافته و بیماری‌های ژنتیکی ارتباط برقرار کنند، پیشرفت بیماری‌ها را پیش‌بینی کنند، و داروها یا درمان‌های ژنتیکی را برای هر فرد ابداع نمایند.

احتمالاً تا چند سال دیگر، امکان تعیین توالی معمولی ژنوم افراد فراهم می‌گردد. هر چند، هم اکنون فناوری‌های دیگری برای جستجوی تنوع‌های ژنتیکی در دسترس قرار دارند که شواهدی را در خصوص پتانسیل فردی برای ابتلاء به بیماری‌های خاص فراهم می‌سازند. تصور می‌شود تا ۱۵ میلیون جایگاه در داخل ژنوم انسانی ممکن است از فردی به فرد دیگر، به‌صورت چندشکلی‌های تک - نوکلئوتیدی (SNP[2])، متفاوت باشد. با استفاده از فناوری‌های ریزآرایه (ص ۴۰۴) می‌توان تا ۵۰۰ ۰۰۰ مورد SNP را در یک زمان در صدها تا هزاران فرد مورد جستجو قرار داد. تا اکتبر ۲۰۰۷، یک نقشه هالوتیپی انسان (Hap Map) از بیش از ۳٫۱ میلیون SNP تولید شده بود. با ظهور SNPهای اختصاصی یا ترکیبی از SNPها، ارتباطی بین آنها و بیماری‌هایی نظیر دیابت نوع ۱ و اوتیسم[3] در حال شکل‌گیری است.

۴-۷ • DNA نوترکیب، کلون‌سازی و انتخاب کلون‌ها

DNA منابع مختلف را می‌توان به یکدیگر متصل نمود تا یک گونه جدید DNA حاصل شود: DNA نوترکیب

توانایی شکستن انتخابی جمعیتی از ملکول‌های DNA با آندونوکلئازهای محدودکننده منتهی به تکنیکی برای اتصال دو ملکول DNA مختلف و تولید DNA نوترکیب شد. این

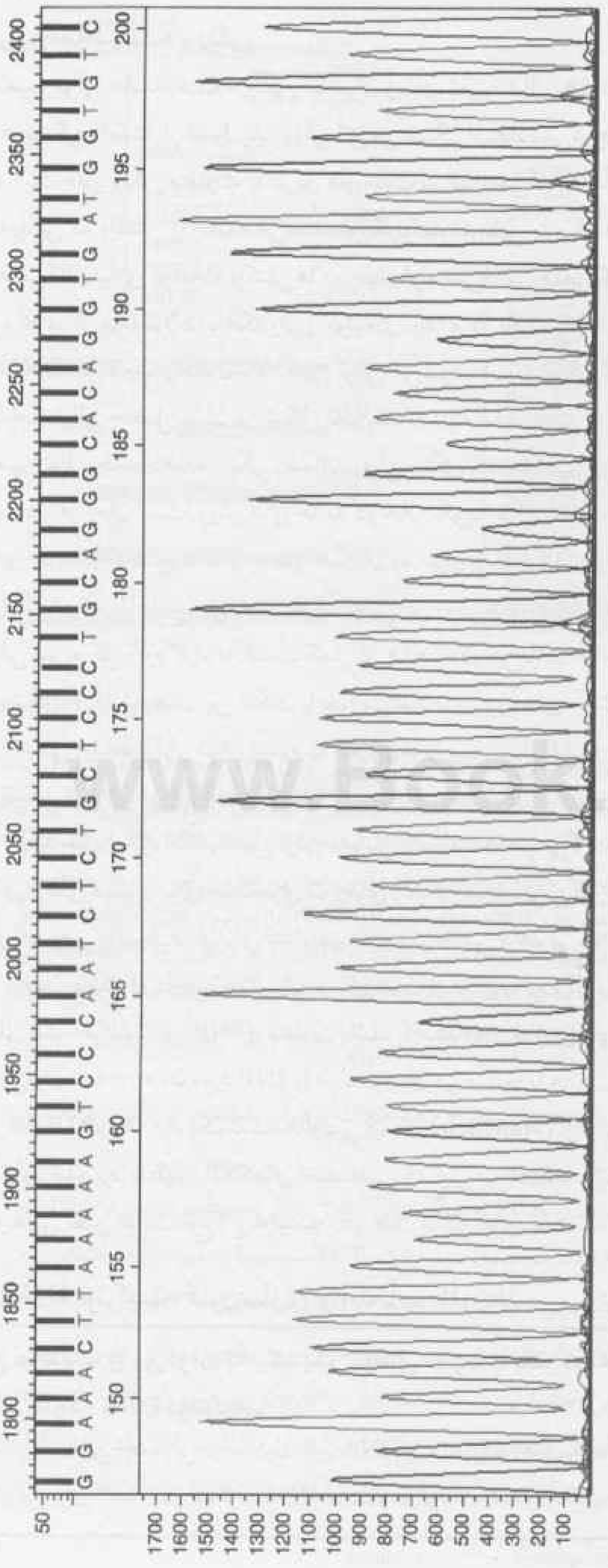
ارتباط بالینی ۴-۷

تعیین توالی مستقیم DNA برای تشخیص سندروم بلوم: یک ناهنجاری ژنتیکی

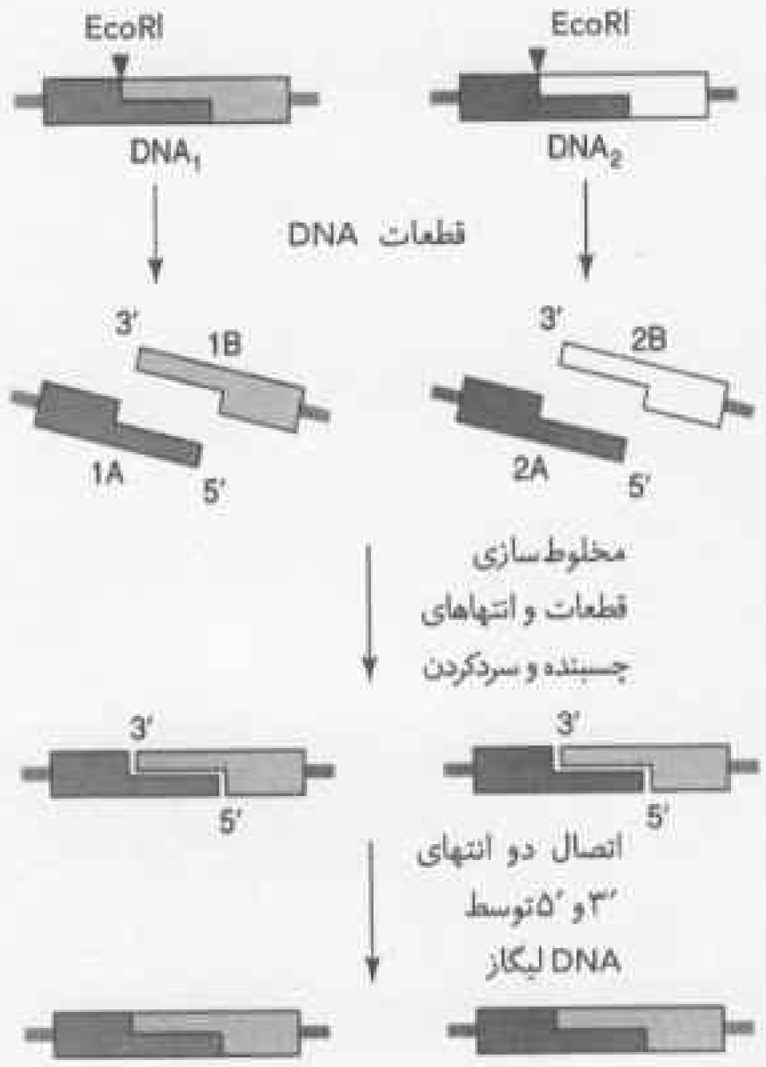
روش‌های ابتدایی تعیین توالی نواحی DNA یا ژن‌هایی که ممکن است با ناهنجاری‌های ژنتیکی در ارتباط باشند، پرهزینه و وقت‌گیر هستند و همگی در اغلب موارد غیرصحیح می‌باشند. تعیین توالی مستقیم DNA ژنومی که به‌طریق PCR ازدیاد یافته است، این نواقص را برطرف می‌کند. سندروم بلوم[1] (BS) (OMIM ۲۱۰۹۰۰) یک بیماری اتوزومال مغلوب نادر است. بیماران مبتلا به BS تمامی انواع سرطان را بیش از جمعیت عمومی نشان می‌دهند. سلول‌های مربوط به بیماران BS با میزان بالای ناپایداری ژنتیکی مشخص می‌شوند. تشخیص رایج BS براساس جستجوی میزان بالای (حدود ۱۰ برابر) تغییرات کروماتید خواهر در سلول‌های بیمار است. تعیین توالی مستقیم DNA ژنومی برای غربال جهش‌های موجود در ژن BLM (سندروم بلوم) بیماران مشکوک به BS مورد استفاده قرار گرفت. با این روش چهار جهش در ژن BLM یافت شد. تمامی این جهش‌ها (سه مورد جهش تغییر قالب و یک مورد جهش بی‌معنی) منجر به ایجاد یک کدون خاتمه می‌شوند. تصور می‌رود که این رهیافت امکان برقراری ارتباط مستقیم بین این جهش‌ها و وضعیت بالینی بیمار را فراهم می‌سازد.

1. Bloom syndrome

1. Dye-terminator sequencing 2. Single-nucleotide polymorphisms 3. Autism



شکل ۵-۷ کروماتوگرام توالی DNA حاصل از روش تعیین توالی خاتمه‌دهنده-رنگی. توالی نسبی DNA متالوپروتئیناز ماتریکسی ۲ (MMP2) گرانولوسیت انسانی که به طریق PCR ازدیادیافته است، مشاهده می‌گردد. هر ddNTP با یک فلورسنت رنگی متفاوت دم‌دار شده است. رنگ هر قله مربوط به نوکلئوتید رنگی فهرست‌شده در بالای شکل می‌باشد.



شکل ۶-۷ تولید DNA نوترکیب از قطعات حاصل از آندونوکلئاز محدودکننده حاوی انتهاهای چسبنده. بسیاری از آندونوکلئازهای محدودکننده DNA را به طریق پله‌ای شکسته و تولید قطعاتی با نواحی تک-رشته در انتهای ۵' و انتهای ۳' می‌کنند. قطعات DNA حاصل از ملکول‌های مختلف DNA با یک آندونوکلئاز محدودکننده، دارای انتهاهای تک-رشته مکملی هستند که آنها را می‌توان سرد و به‌طریق کووالان با یک DNA لیگاز متصل نمود. در یک مخلوط، تمامی ترکیب‌های مختلف ممکن می‌باشند. وقتی دو قطعه DNA با منشاء متفاوت ترکیب می‌شوند، یک ملکول DNA نوترکیب حاصل می‌گردد.

روش به همراه تکنیک‌های همانندسازی، جداسازی و تعیین هویت، امکان تولید مقادیر زیادی قطعات DNA خالص را فراهم نمود. مجموعه این تکنیک‌ها که فناوری **DNA نوترکیب** نامیده می‌شود، امکان برداشت قطعه‌ای از DNA را از میان یک ملکول پیچیده بزرگتر، نظیر ژنوم یک ویروس یا انسان، و ازدیاد این قطعه DNA را فراهم می‌سازد. اتصال دو قطعه متفاوت DNA به کمک یک آندونوکلئاز محدودکننده و یک DNA لیگاز انجام می‌شود. برای این منظور از آندونوکلئازهای محدودکننده متعددی استفاده می‌شود (قسمت ۳-۷) که از نظیر ویژگی توالی نوکلئوتیدی با یکدیگر اختلاف دارند. برخی از این آنزیم‌ها هر دو رشته DNA را به طریق پله‌ای[1] شکسته و تولید انتهاهای چسبنده[2] می‌کنند (شکل ۶-۷)، در حالی که بقیه هر دو رشته را به‌طور قرینه شکسته و انتهای صاف یا همتراز[3] به وجود می‌آورند. یک آنزیم محدودکننده اختصاصی DNA را دقیقاً در یک جایگاه توالی می‌شکند و توجهی به منبع DNA (باکتریایی، گیاهی، مربوط به پستانداران و غیره) ندارد. یک ملکول DNA ممکن است برای یک آندونوکلئاز محدودکننده خاص فاقد جایگاه شناسایی بوده و یا جایگاه‌های متعددی داشته باشد. برش پله‌ای منجر به تولید قطعات DNAای با انتهاهای تک-رشته می‌شود. وقتی قطعات DNA مختلف حاصل از یک آندونوکلئاز محدودکننده مخلوط شوند، انتهاهای تک-رشته آنها می‌توانند با یکدیگر هیبرید و یا سرد[4] شوند. سپس DNA لیگاز این دو قطعه را به یکدیگر دوخته[5] تا تولید یک ملکول DNA نوترکیب شود.

قطعات DNA حاوی انتهاهای صاف را می‌توان به یکدیگر متصل نمود، ولی کارایی آن بسیار کم است. با افزودن آنزیمی دم پلی (A) به یک قطعه DNA و دم پلی (T) به قطعه دیگر، این کارایی افزایش می‌یابد. سپس قطعات حاوی دم‌های مکمل می‌توانند سرد شده و به یکدیگر دوخته شوند.

ناقلین DNA نوترکیب به طریق کلون‌سازی تولید می‌شوند

برای قراردادن یک DNA نوترکیب در داخل سلولی که امکان همانندسازی DNA نوترکیب را فراهم می‌سازد، می‌توان DNA موردنظر را تکثیر داد. یک DNA حامل یا ناقل کلون‌سازی انتخاب می‌شود. پلاسمیدهای باکتریایی به عنوان ناقلین DNA نوترکیب ایده‌آل هستند.

بسیاری از باکتری‌ها حاوی یک کروموزوم حلقوی با حدود 4×10^6 جفت باز (bp) و ملکول‌های DNA ریزحلقوی[6] به‌نام **پلاسمید** هستند. پلاسمیدها معمولاً تنها حاوی چند هزار جفت باز بوده و به ندرت ارتباطی با کروموزوم بزرگتر دارند. ژن‌های موجود در یک پلاسمید شامل انواعی هستند که سبب مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند و این مقاومت برای انتخاب کلونی‌های اختصاصی باکتری‌ها مفید می‌باشد. همانندسازی

1. Staggered
2. Sticky or cohesive
3. Blunt
4. Anneal (اتصال دو رشته اسید نوکلئوتیدی مکمل به یکدیگر با سردنمودن تدریجی)
5. Ligate
6. Minicircular

پلاسمیدها مستقل از همانندسازی کروموزوم باکتریایی اصلی صورت می‌گیرد. یکی از انواع پلاسمیدها، تحت عنوان پلاسمید **کنترل- شل شده**[1]، ممکن است به تعداد ده‌ها یا صدها نسخه در هر باکتری وجود داشته باشد و همانندسازی آن تنها بستگی به آنزیم‌هایی از میزبان دارد که نیمه-عمر آنها طولانی است. لذا همانندسازی **پلاسمیدهای شل‌شده** در حضور یک مهارکننده سنتز پروتئین رخ می‌دهد. تحت این شرایط، هزاران نسخه پلاسمید در هر سلول باکتری تجمع می‌یابد. به همین دلیل معمولاً از پلاسمید نوع شل‌شده برای تولید DNA نوترکیب استفاده می‌شود. در پلاسمیدهایی که در معرض **کنترل سخت**[2] قرار دارند، همانندسازی بستگی به ادامه سنتز پروتئین‌های کدشده توسط پلاسمید دارد. این پلاسمیدها تقریباً با همان سرعت کروموزوم بزرگ باکتریایی همانندسازی می‌شوند و تنها چند نسخه از آنها در هر سلول وجود دارد.

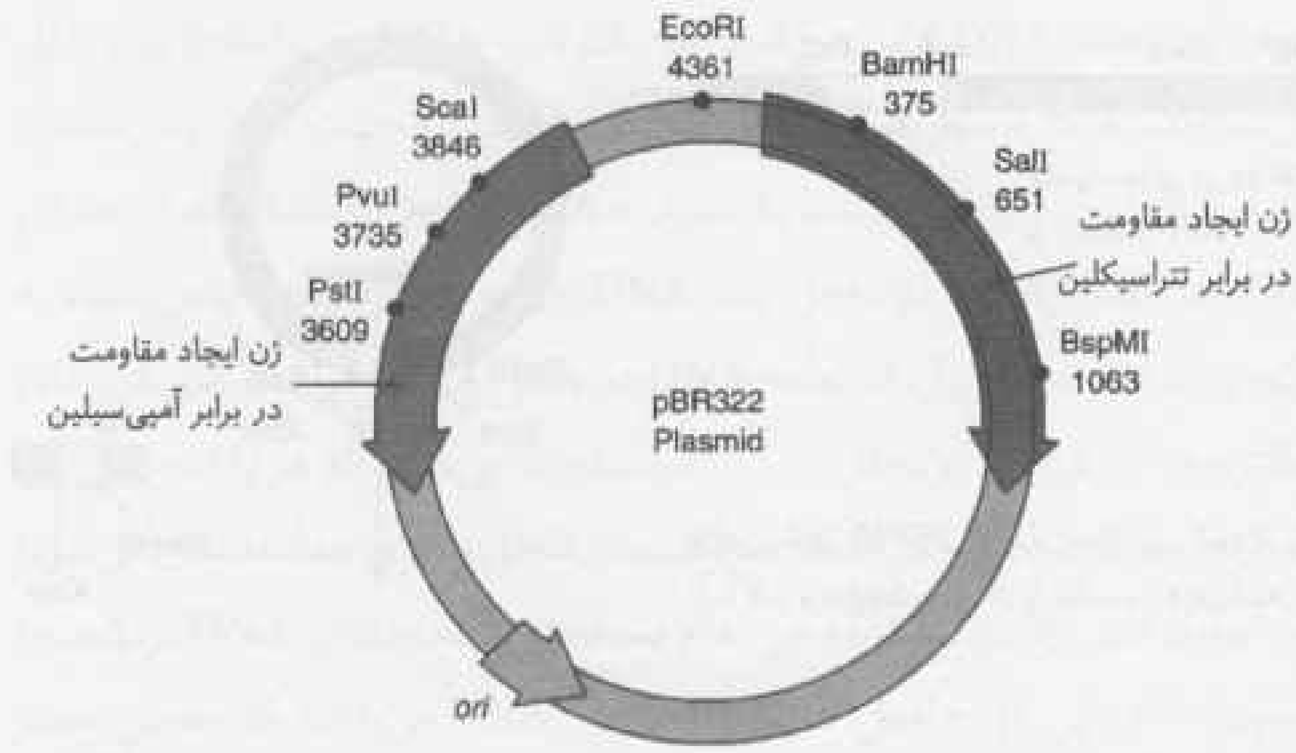
اولین DNA نوترکیب عملی حاوی DNA خارجی اتصال‌یافته به **پلاسمید pSC101** باکتری *E.coli* بود که حاوی یک جایگاه برای آندونوکلئاز محدودکننده EcoRI و ژن ایجاد مقاومت در باکتری است. این پلاسمید حاوی یک مبداء برای همانندسازی و توالی‌های DNA تنظیمی مربوطه می‌باشد که مجموعاً **رپلیکون** نامیده می‌شوند. هرچند، تک جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده آن سبب محدودیت قطعات DNAای می‌شود که قابل‌کلون‌سازی در قطعات حاصل از EcoRI می‌باشند؛ یک نشانگر قابل انتخاب مقاومت- آنتی‌بیوتیکی سبب کاهش قابلیت انتخاب شده و این پلاسمید همانندسازی ضعیفی دارد.

ناقلین پلاسمیدی با گستردگی وسیع، به طریق فناوری DNA نوترکیب ساخته می‌شوند. خصوصیات دلخواه یک ناقل پلاسمیدی شامل وزن ملکولی نسبتاً پایین (۳ تا ۵ کیلوباز [kb]) برای جادادن در قطعات بزرگتر، چندین جایگاه محدودکننده متفاوت که برای کلون‌سازی انواع مختلفی از قطعات مفید هستند، چندین نشانگر قابل انتخاب برای کمک به انتخاب باکتری‌های حاوی ملکول‌های DNA نوترکیب و سرعت بالای همانندسازی می‌باشند. اولین پلاسمیدی که ساخته شد (شکل ۷-۷) تا این نیازها را برطرف کند، **pBR322** بود که برای تولید ناقلین متعدد مورد استفاده امروزی به‌کار می‌رود. این ناقلین حاوی یک توالی DNA الحاقی به‌نام **چندرابط**[3]، **بانک جایگاه محدودکننده**[4]، یا **جایگاه چند کلون‌سازی**[5]، می‌باشند که حاوی جایگاه‌های آندونوکلئاز متعدد بی‌همتا برای پلاسمید است.

کلون‌سازی جهت‌دار: DNA با یک جهت اختصاصی در داخل DNA ناقل قرار داده می‌شود

کلون‌سازی جهت‌دار سبب کاهش تعداد نوترکیب‌های متغیر و افزایش احتمال انتخاب نوترکیب مورد نظر می‌شود. الحاق DNA خارجی با یک قطبیت مشخص، در داخل یک

1. Relaxed-control plasmid 2. Stringent control 3. Polylinker 4. Restriction site bank 5. Polycloning site



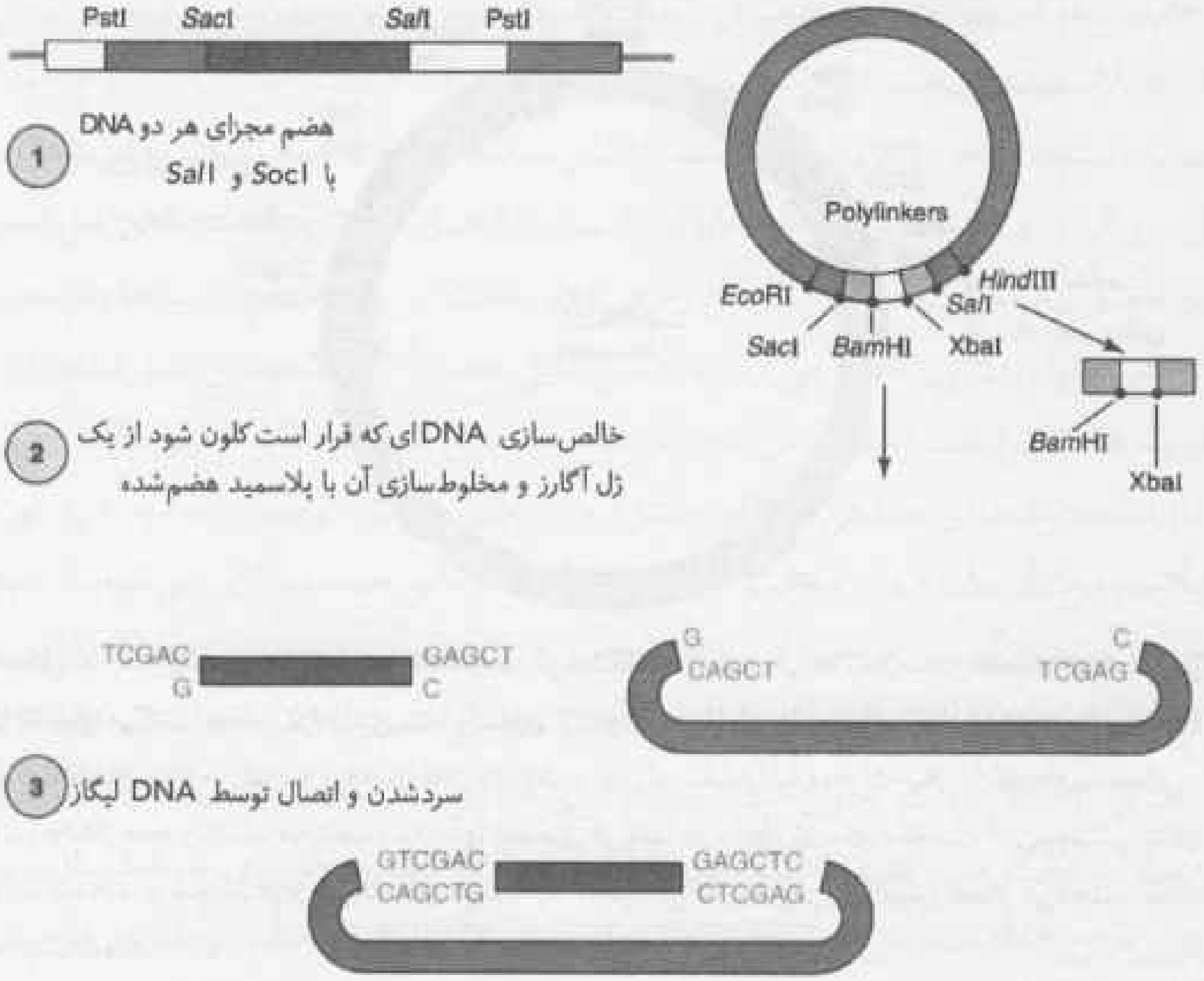
شکل ۷-۷ پلاسمید pBR322 ساخته‌شده در آزمایشگاه از خصوصیاتی که کلون‌سازی قطعات DNA خارجی را تسهیل می‌کنند. به‌طور قراردادی شماره‌گذاری نوکلئوتیدها با اولین T در توالی شناسایی بی‌همتای EcoRI (GAATTC) شروع می‌شود و موقعیت‌های موجود بر روی این نقشه اشاره به ′5- باز جایگاه‌های شناسایی - آندونوکلئاز محدودکننده مختلف دارد. تنها تعدادی از اینها در داخل ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داده شده‌اند و هیچکدام از جایگاه‌های مربوط به آنزیم‌هایی که بیش از یک برش انجام می‌دهند، نشان داده نشده‌اند.

ناقل پلاسمیدی بدون‌خود اتصالی پلاسمید را می‌توان با استفاده از دو آندونوکلئاز محدود-کننده انجام داد (شکل ۸-۷)؛ برای این منظور، ناقلین حاوی چندرابط، مناسب هستند. استفاده از دو آنزیم سبب تولید قطعات DNA و پلاسمیدهای خطی‌شده با دو انتهای چسبنده متفاوت می‌شود. تحت این شرایط پلاسمید نمی‌تواند دوباره با خودش سرد شود. این موضوع به‌خصوص زمانی فوق‌العاده مهم است که فرد یک ژن وظیفه‌دار بالقوه را در فرودست عناصر پروموتری- تنظیمی در داخل ناقلین بیانی کلون می‌کند.

باکتری‌هایی که با DNA نوترکیب ترانسفورمه شده‌اند و نیاز به یک فرایند انتخاب

ارائه مصنوعی DNA به داخل باکتری‌ها را **ترانسفورماسیون** گویند. به‌طور خلاصه این عمل با قراردادن سلول‌ها در معرض کاتیون‌های دو ظرفیتی انجام می‌شود که آنها را به‌طور گذرا نسبت به ملکول‌های کوچک DNA نفوذپذیر می‌کنند. سپس ملکول‌های پلاسمید نوترکیب حاوی DNA خارجی وارد باکتری‌ها شده و به‌طورطبیعی همانندسازی می‌کنند.

وقتی یک پلاسمید به داخل یک باکتری ارائه شد، هر دو می‌توانند همانندسازی کنند. طی فرایند ترانسفورماسیون، برخی باکتری‌ها ممکن است پلاسمیدی را برداشت نکنند و یا با ناقلی ترانسفورمه شوند که فاقد DNA خارجی است؛ در هنگام آماده‌سازی ممکن است ناقلین بدون برداشت DNA خارجی دوباره بسته شوند. در برخی شرایط تجربی، قطعات DNAای تولید می‌شوند که به راحتی از گونه‌های DNA شدیداً خالص کوچک،



شکل ۸-۷ کلون‌سازی جهت‌دار DNA خارجی در داخل ناقلین با یک جهت اختصاصی. قرارگیری یک قطعه DNA خارجی در داخل یک ناقل با یک جهت اختصاصی نیاز به دو توالی سردشدن (جفت‌شدن) در دو انتهای قطعه و توالی مکمل مربوطه در دو انتهای تولیدی در ناقل دارد. دو توالی سردشدن متفاوت توسط آندونوکلئازهای محدودکننده اختصاصی تولید می‌شوند که هر دو قطعه DNA را در ناقل هیدرولیز می‌کنند. یک چندرابط با جایگاه‌های آندونوکلئاز محدودکننده بی‌همتای متعدد در داخل ناقل سبب تسهیل کلون‌سازی جهت‌دار می‌شود. شناخت نقشه محدودکننده برای DNA مورد نظر، امکان انتخاب آندونوکلئازهای محدودکننده مناسب را فراهم می‌سازد.

برای مثال برخی DNA ویروس‌ها، تخلیص می‌گردند. هر چند، در حالت معمول‌تر، آندونوکلئاز محدودکننده قطعات متعدد DNA را تولید می‌کنند که تعداد آنها بستگی به اندازه و پیچیدگی DNA مورد استفاده دارد و قطعات مجزا را نمی‌توان از این نمونه‌ها جدا نمود. آندونوکلئازهای محدودکننده لزوماً تولید قطعاتی نمی‌کنند که حاوی ژن‌های سالم باشند. یک قطعه ممکن است حاوی کل ژن باشد ولی فاقد توالی‌های تنظیمی طرفی نظیر ناحیه پروموتری باشد. در صورتی که ژن خارجی منشاء پستانداران را داشته باشد، توالی‌های تنظیمی آن توسط ماشین سنتتیک باکتریایی شناخته نمی‌شوند. رونوشت ژنی اولیه (pre-mRNA) ممکن است حاوی اینترون‌هایی باشد که قابل پردازش توسط باکتری‌ها نباشند. روش‌هایی برای انتخاب باکتری‌هایی ابداع شده‌اند که حاوی DNA مورد نظر هستند.

ملکول‌های DNA نوترکیب در یک کتابخانه ژنی

وقتی یک مخلوط پیچیده از هزاران ژن مختلف که بر روی کروموزوم‌های مختلف مثل حالت موجود در ژنوم انسانی قرار دارند، در معرض تجزیه توسط یک آندونوکلئاز محدودکننده

قرار گیرد، هزاران قطعه DNA تولید می‌شود. این قطعات DNA می‌توانند با یک ناقل پلاسمیدی سرد شوند که توسط همان آندونوکلئاز محدودکننده جهت تولید یک ملکول خطی شکسته شده است. با تنظیم نسبت پلاسمید به DNAخارجی، احتمال اتصال حداقل یک نسخه از هر قطعه DNA در داخل یک DNA پلاسمید-نوترکیب حلقوی‌شده به یک نزدیک می‌شود. معمولاً تنها یک قطعه DNA در داخل هر ناقل پلاسمیدی قرار داده می‌شود. باکتری‌ها طوری با ملکول‌های نوترکیب ترانسفورمه می‌شوند که هر پلاسمید توسط یک باکتری برداشت گردد. سپس هر ملکول نوترکیب در داخل باکتری همانندسازی می‌شود؛ نتیجه تولید سلول‌های اولادی است که هر کدام نسخه‌های متعددی از DNA نوترکیب را دارند. جمعیت باکتریایی کل حاصل حاوی قطعاتی از DNA می‌باشند که ممکن است نماینده‌ای از کل ژنوم انسانی باشند. این را یک **کتابخانه ژنی**[1] گویند. همانند هر کتابخانه‌ای که حاوی هزاران جلد می‌باشد، لازم است یک سیستم انتخاب در دسترس قرار داشته باشد تا کتاب یا ژن مورد نظر را بتوان دوباره به دست آورد.

پلاسمیدها معمولاً برای کلون‌سازی قطعات حاصل از DNA با اندازه و پیچیدگی محدود، نظیر ویروس‌ها، و کلون‌سازی مجدد[2] قطعات بزرگ DNAای که قبلاً در سایر ناقلین کلون شده‌اند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. قطعات DNA ژنومی معمولاً از ناقلینی کلون می‌شوند که می‌توانند قطعات DNA خارجی بزرگتری نسبت به پلاسمیدها حمل کنند (ص ۳۷۷).

انتخاب باکتری‌های ترانسفورمه به‌واسطه از دست رفتن مقاومت آنتی‌بیوتیکی

وقتی یک باکتری ترانسفورمه حاوی یک DNA نوترکیب تکثیر می‌یابد، تمامی سلول‌های اولاد حاصل حاوی نسخه‌هایی از پلاسمید نوترکیب یکسان خواهند بود. مشکل نحوه شناسایی کلونی است کـه حاوی پلاسمید موردنظر در میدانی از هـزاران تا میلیون‌ها کلونی‌های باکتریایی مختلف می‌باشد. پلاسمید ساخته شده pRB322 و تغییریافته‌های آن حامل دو ژن می‌باشند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد کرده و نسبت به آندونوکلئازهای محدودکننده متعددی حساس هستند. وقتی یک قطعه DNA خارجی در یک جایگاه محدودکننده موجود در داخل یکی از این دو ژن قرار داده شود، این ژن غیرفعال شده و باکتری‌های حامل این پلاسمید نوترکیب به آن آنتی‌بیوتیک حساس می‌شوند. (شکل ۱۰-۷). هر چند ژن دوم مقاومت به آنتی‌بیوتیک موجود در داخل پلاسمید سالم باقیمانده و این باکتری‌ها نسبت به آن آنتی‌بیوتیک مقاوم خواهند ماند. این **غیرفعال‌سازی الحاقی**[3] محصولات ژن پلاسمیدی، امکان انتخاب باکتری‌هایی را فراهم می‌سازد که حامل پلاسمیدهای نوترکیب هستند.

1. Gene library 2. Subcloning 3. Insertional inactivatiuon

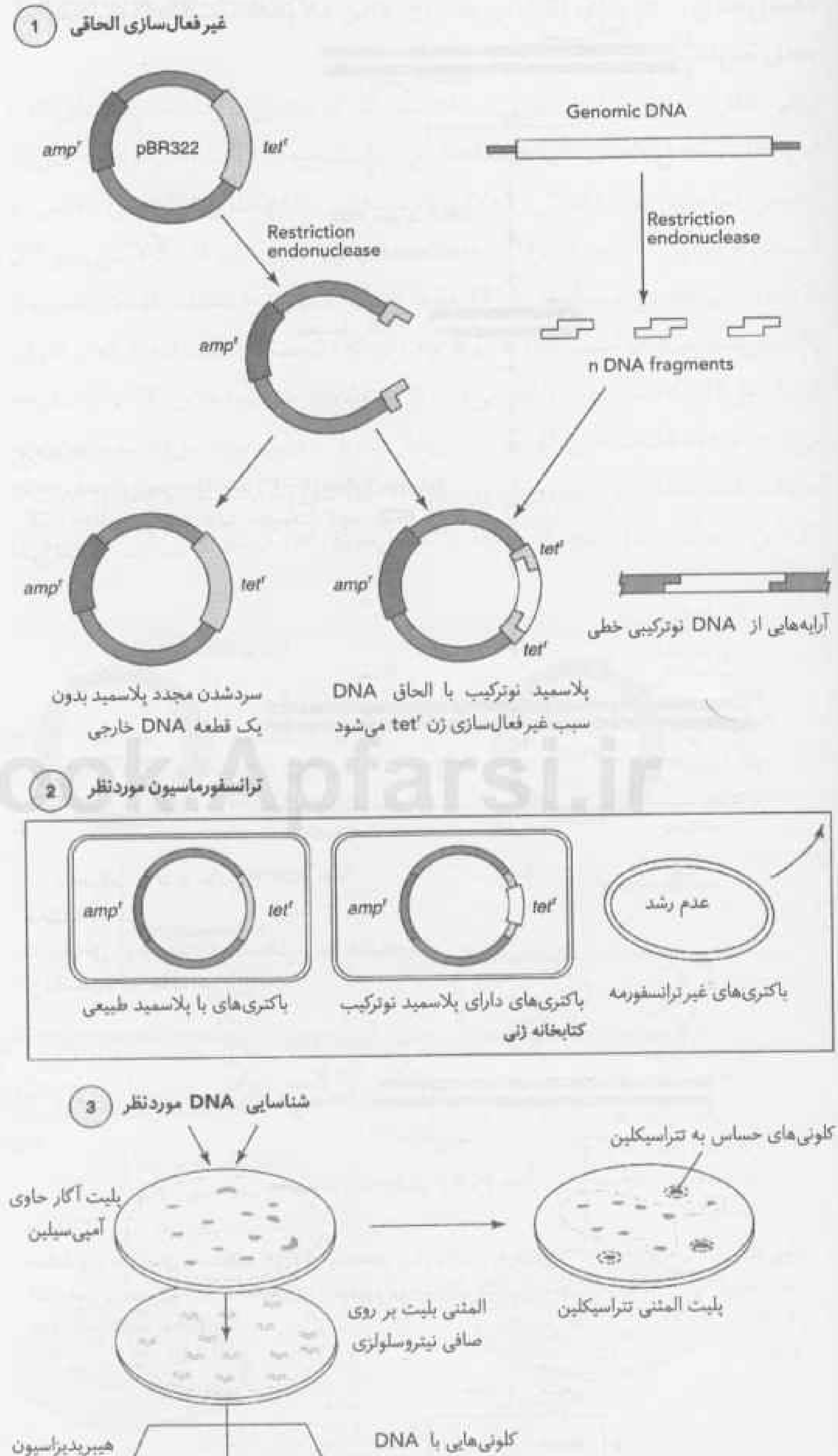
pBR322 حاوی ژن‌هایی است که مقاومت به **آمپی‌سیلین** (amp^r) و **تتراسیکلین** (tet^r) را به وجود می‌آورند. یک کتابخانه ژنی قطعات DNA سلولی قرار داده شده در داخل ژن tet^r را می‌توان طی دو مرحله غربال نمود (شکل ۹-۷). ابتدا باکتری‌ها در محیط رشد حاوی آمپی‌سیلین کشت داده می‌شوند. باکتری‌هایی که ترانسفورمه نشده‌اند، به دلیل نداشتن یک پلاسمید طبیعی یا نوترکیب در حضور این آنتی‌بیوتیک رشد نخواهند کرد و این جمعیت باکتری‌ها حذف می‌شود. هر چند این انتخاب نمی‌تواند نشان دهد که باکتری‌های زنده باقیمانده حاوی یک پلاسمید نوترکیب یا یک پلاسمید فاقد DNA الحاقی است. مرحله دوم برای شناسایی باکتری‌هایی است که حامل ناقلین نوترکیب با ژن‌های tet^r غیرفعال می‌باشد که برهمین اساس حساس به تتراسیکلین هستند.

باکتری‌های مقاوم به آمپی‌سیلین بر روی پلیت آگارهای حاوی آمپی‌سیلین کشت داده می‌شوند (شکل ۹-۷). یک صافی با کلونی‌های موجود در پلیت آگار اصلی تماس داده شده و سپس این صافی با پلیت‌های استریل دیگری تماس داده می‌شود تا بدین ترتیب پلیت‌های المثنی[1] از نظر موقعیت کلونی‌ها به دست آید. تمامی پلیت‌ها حاوی بخشی از هر کلونی اصلی در موقعیت‌های قابل‌شناسایی بر روی پلیت‌ها هستند. پلیت المثنی می‌تواند حاوی تتراسیکلین باشد که باکتری‌های حاوی ژن تخریب‌شده tet^r را خواهد کشت. با مقایسه پلیت‌های المثنی دارای و فاقد تتراسیکلین مشخص می‌شود که کدام کلونی‌های پلیت آمپی‌سیلین ابتدایی حاوی پلاسمیدهای نوترکیب هستند.

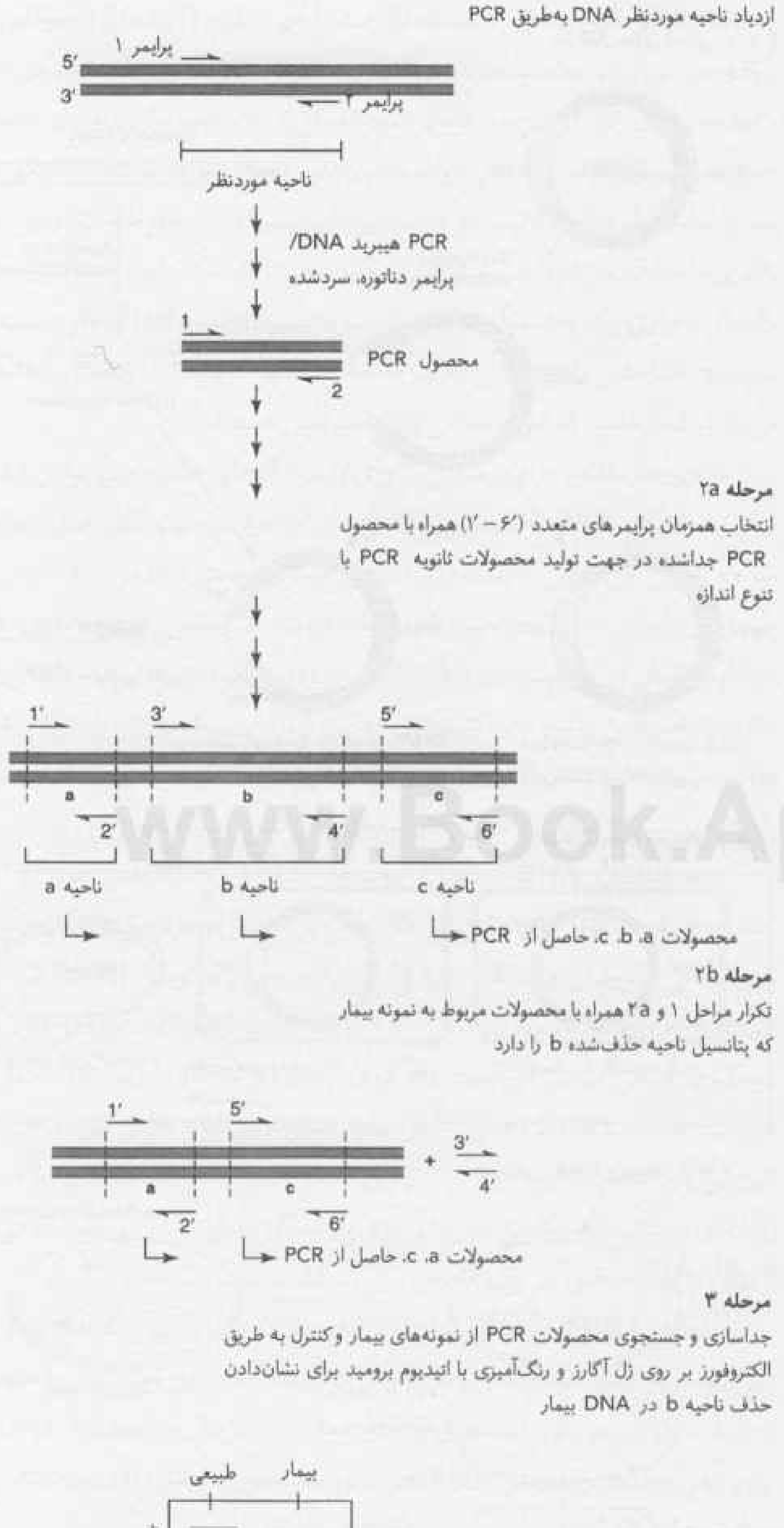
برای شناسایی DNA موردنظر از پروب‌های DNA یا RNA (ص. ص. ۳۶۶ و ۳۶۸) استفاده می‌شود. کلونی‌های باکتریایی مقاوم به آمپی‌سیلین موجود بر روی آگار را می‌توان بر روی صافی نیتروسلولزی منتقل نمود و سلول‌های چسبیده توسط NaOH لیز می‌شوند (شکل ۹-۷). DNA موجود در باکتری‌لیزشده نیز توسط NaOH دناتوره می‌شود و به‌طور محکم به صافی متصل می‌گردد. یک پروب DNA یا RNA نشاندار که مکمل DNA مورد نظر است، با DNA متصل به نیتروسلولز هیبرید می‌شود. سپس این صافی به طریق اتورادیوگرافی اشعه-X مورد آزمایش قرار گیرد که هر کلونی حامل DNA کلون‌شده مورد نظر را آشکار می‌کند. لکه‌ها کلونی‌هایی را بر روی پلیت اگار اصلی نشان می‌دهند که می‌توان آنها را برای کارهای بعدی در یک مقیاس - بزرگ کشت داد.

قطعات DNA کلون‌شده یا ازدیادیافته معمولاً فاقد یک ژن کامل بوده و بیان نمی‌شوند. هر چند، الحاق‌های DNA را می‌توان به راحتی برای تعیین‌توالی تخلیص نمود و یا به عنوان پروب برای جستجوی ژن‌های موجود در داخل یک مخلوط DNA ژنومی، برای آزمون مقادیر رونویسی mRNA و برای جستجوی جهش‌های تولیدکننده بیماری مورد استفاده قرار داد.

1. Replica plates



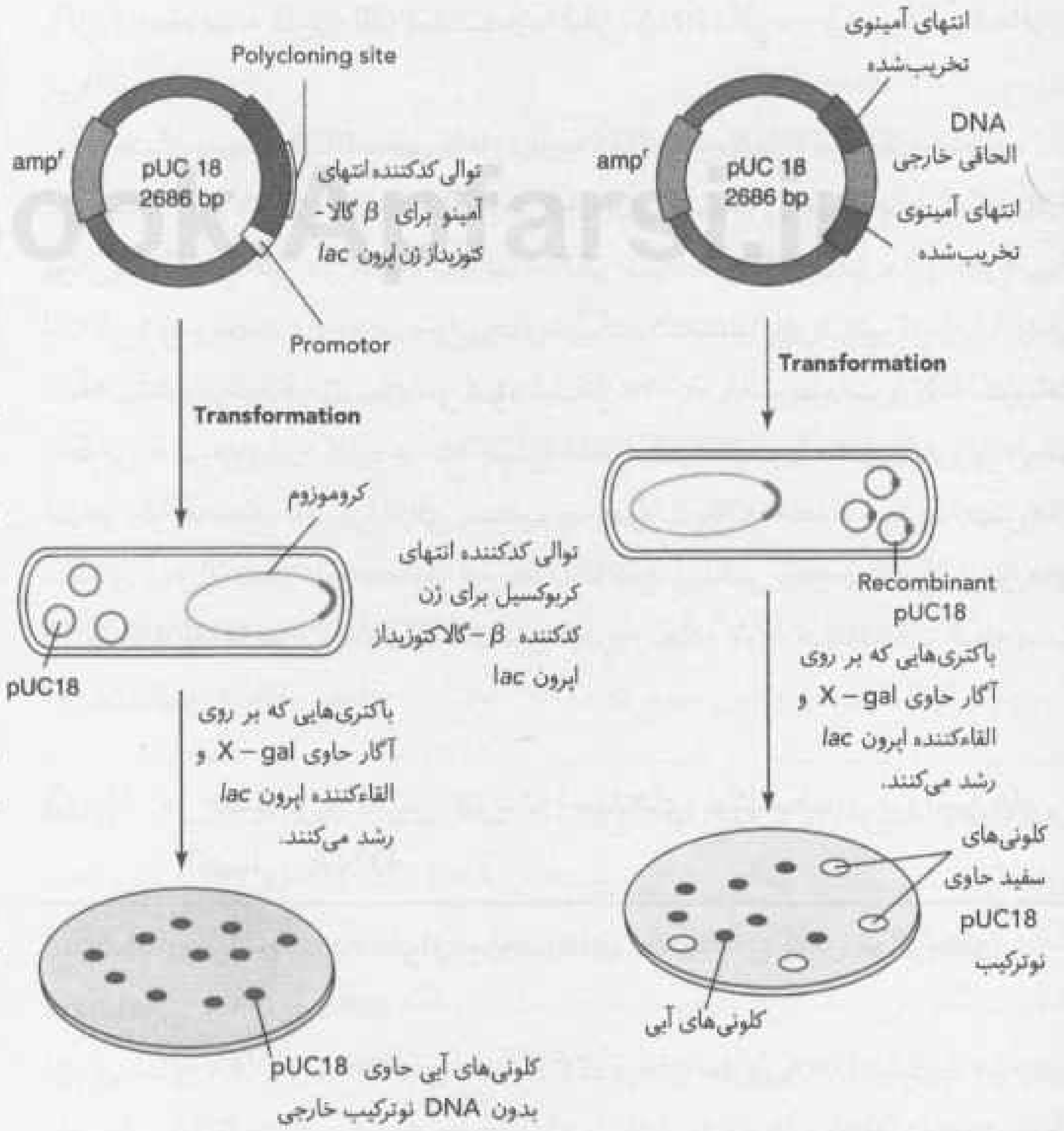
شکل ۹-۷ غیرفعال‌سازی الحاقی پلاسمیدهای نوترکیب و جستجوی باکتری‌های ترانسفورمه‌شده حامل DNA کلون شده مورد نظر. وقتی الحاق یک قطعه DNA خارجی در داخل یک ناقل سبب تخریب یک ژن وظیفه‌دار می‌شود، DNA نوترکیب حاصل دیگر آن ژن را بیان نمی‌کند. ژنی که مقاومت به تتراسیکلین راکد می‌کند (Tet^r) با الحاق DNA تخریب می‌شود، در حالی‌که ژن مقاومت به آمپی‌سیلین (Amp^r) وظیفه‌دار باقی می‌ماند. تخریب یک ژن مقاومت و حفظ ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک دیگر، امکان جستجوی کلونی‌های باکتریایی حاوی DNA خارجی مورد نظر در داخل ناقل نوترکیب همانندساز را فراهم می‌سازد.



شکل ۱۰-۷ PCR مولتی‌پلکس برای آنالیز یک ناحیه موردنظر از DNA جهت وجود جهش. یک ناحیه DNA موجود در داخل یک ملکول DNA پیچیده به طریق PCR با پرایمرهایی که مکمل توالی‌های موجود در اطراف DNA موردنظر هستند، تکثیر داده می‌شود (مرحله ۱). سپس محصول PCR به‌طور همزمان به‌عنوان یک الگو برای چندین جفت پرایمر مورد استفاده قرار می‌گیرد (مرحله ۲a) که در سرتاسر DNA مکمل هستند (در اینجا، سه قطعه a، b و c را می‌پوشانند). این روش نیاز به شناخت قبلی از توالی DNA یا ژن طبیعی دارد. مرحله ۲a برای DNA حاصل از یک بیمار دارای جهش(های) بالقوه در ناحیه DNA مورد نظر تکرار می‌شود (مرحله ۲b). سپس محصولات DNA ازدیادیافته از مرحله PCR مولتی‌پلکس (مراحل ۲a و ۲b) به‌طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار می‌گیرند تا از وجود جهش در نمونه بیمار اطمینان حاصل شود (مرحله ۳).

تکمیل‌سازی- α برای انتخاب باکتری‌هایی که پلاسمیدهای نوترکیب را حمل می‌کنند

برخی ناقلین (سری pUC) طوری ساخته شده‌اند که باکتری‌های انتخاب‌شده‌ای که با این ناقلین حامل الحاق‌های DNA خارجی ترانسفورمه شده‌اند را می‌توان به‌صورت چشمی شناسایی نمود (شکل ۱۱-۷). پلاسمیدهای pUC حاوی توالی‌های تنظیمی و قسمتی از توالی کدکننده ′۵ (۱۴۶ اسید آمینه انتهای آمینوی) ژن β-گالاکتوزیداز (ژن lac Z) اپرون lac می‌باشند (ص ۴۱۵). قطعه انتهای آمینوی ترجمه‌شده β-گالاکتوزیداز یک پلی‌پپتید غیرفعال است. *E.coli* جهش‌یافته‌ای که قسمت از دست‌رفته غیرفعال انتهای کربوکسیل β-گالاکتوزیداز را کد می‌کند، با استفاده از پلاسمیدهای pUC ترانسفورمه می‌شود. ترجمه قسمت‌های β-گالاکتوزیداز مربوط به سلول میزبان و پلاسمید در پاسخ به یک القاءکننده، یعنی **ایزوپروپیل تیو- β-D-گالاکتوزید**، یکدیگر را تکمیل نموده تا یک آنزیم فعال حاصل شود. این فرایند را **تکمیل‌سازی α**[1] گویند. وقتی این باکتری‌های



شکل ۱۱-۷ تکمیل‌سازی- α برای جستجوی باکتری‌های ترانسفورمه‌شده. یک ناقل ساخته‌شده (pUC18) توالی کدکننده انتهای آمینوی β-گالاکتوزیداز اپرون lac را بیان می‌کند. جهش‌یافته‌های باکتریایی کدکننده قسمت انتهای کربوکسیل β-گالاکتوزیداز با pUC18 ترانسفورمه می‌شوند. این باکتری‌های ترانسفورمه‌شده در حضور یک سوبسترای اختصاصی برای آنزیم سالم (X-gal) تولید کلونی‌های آبی می‌کنند، زیرا این کلونی‌ها آنزیم مورد نیاز برای واکنش با این سوبسترا را دارند. توالی‌های وظیفه‌دار کدکننده انتهای آمینو و انتهای کربوکسیل یکدیگر را تکمیل نموده تا یک آنزیم وظیفه‌دار تولید شود. هر چند، در صورتی‌که یک DNA خارجی در داخل pUC18 اضافه گردد، توالی کدکننده انتهای آمینوی β-گالاکتوزیداز را تخریب می‌کند و باکتری‌هایی که با این ملکول نوترکیب ترانسفورمه شده‌اند، یک آنزیم وظیفه‌دار را تولید نخواهند کرد. کلونی‌های باکتریایی حاوی این ناقلین نوترکیب را می‌توان به‌صورت کلونی‌های سفید مشاهده و جستجو نمود.

1. α-Coplementation

ترانسفورمه در حضور یک سوبسترای رنگزا (۵- برومو-۴-کلرو-۳- اندولیل - β -D- گالاکتوزید [X-gal]) برای β -گالاکتوزیداز رشد داده می‌شوند، کلونی‌های آبی تولید می‌کنند. هر چند در صورتی که یک قطعه DNA خارجی در داخل توالی مربوط به قسمت انتهای آمینوی β -گالاکتوزیداز قرار داده شده باشد، آنزیم فعال قابل تولید نخواهد بود. در صورت کشت بر روی محیط حاوی X-gal، باکتری‌هایی که با این پلاسمیدهای نوترکیب ترانسفورمه شده باشند، تولید کلونی‌های سفید کرده و می‌توان آنها را به طریق چشمی از کلونی‌های آبی غیرترانسفورمه انتخاب نمود.

PCR نیاز به کلون‌سازی DNA را برطرف می‌کند

کلون‌سازی و تکثیر یک قطعه DNA برای کلون‌سازی مجدد، جهش‌زایی و مطالعات تعیین توالی مورد استفاده قرار می‌گیرند. PCR به میزان زیادی جایگزین ازدیاد DNA نوترکیب در یک سیستم بیولوژیکی در حال همانندسازی شده است که به میزان زیادی زمان و مراحل آماده‌سازی مورد نیاز را کاهش می‌دهد. لازم نیست توالی DNA مورد نظر (تا ۶ kb) را برای ازدیاد آن به طریق PCR بدانیم، زیرا توالی DNA ناقل در طرفین توالی الحاقی را می‌دانیم.

احتمال دارد که PCR به‌طور کامل نیاز به کلون‌سازی DNA مورد نظر را برطرف کند. برای مثال، ژنی با توالی شناخته‌شده را می‌توان برای جستجوی جهش‌ها با **راهکار PCR مولتی‌پلکس** به راحتی در DNA یک بیمار آنالیز نمود. DNA از سلول‌های خونی بیمار جدا می‌شود و جفت‌های متعدد پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی برای تکثیر کل ژن یا نواحی انتخاب‌شده موجود در ژن سنتز می‌شوند (شکل ۱۰-۷). آنالیز قطعات DNA تکثیریافته به طریق الکتروفورز ژل آگارز، هر نوع جهش حذفی را در مقایسه با محصولات ژنی طبیعی آشکار خواهد نمود. با تعیین توالی مستقیم محصولات PCR متعدد می‌توان جهش‌های نقطه‌ای را در ژن بیمار مورد جستجو قرار داد. PCR مولتی‌پلکس برای جستجوی نقص‌هایی در ژن HGPRT در مبتلایان به سندروم لیش-نیهان[1] مورد استفاده قرار گرفته است (ارتباط بالینی ۵-۷).

ارتباط بالینی ۵-۷

آنالیز PCR مولتی‌پلکس نقص‌های ژن HGPRTase در سندروم لیش-نیهان

سندروم لیش-نیهان (OMIM ۳۰۰۳۲۲) حاصل کمبود فعالیت هیپوگزانتین-گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HGPRTase) است (ارتباط بالینی ۲-۲۰ را ببینید). چندین شکل واریانت نقص‌های HGPRTase یافت شده است. ازدیاد PCR مولتی‌پلکس لوکوس ژن HGPRT برای آنالیز این ژن در سلول‌های گرفته‌شده از بیماران مبتلا به لیش-نیهان مورد استفاده به‌کار رفت و نتایج تنوع در HGPRTase را نشان دادند. این ژن که شامل ۹ اگزون است را می‌توان با استفاده از ۱۶ پرایمر مختلف در یک واکنش PCR به صورت مولتی‌پلکس ازدیاد داد. محصولات را می‌توان با الکتروفورز بر روی ژل آگارز جدا نمود. آنالیز لوکوس ژن HGPRT با استفاده از ازدیاد مولتی‌پلکس DNA مشتق از سلول‌های چندین بیمار همراه با یافتن تنوع‌های زیادی از حذف نواحی از اگزون‌ها تا عدم وجود اگزون‌های کامل بود.

۵-۷ • جستجو و تعیین هویت اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های اتصالی DNA

اسیدهای نوکلئیک به عنوان پروب‌های اختصاصی برای توالی‌های اختصاصی DNA یا RNA

از پروب‌های DNA و RNA برای انتخاب باکتری‌های حاوی DNA نوترکیب مورد نظر، برای آنالیز RNA بیان‌شده در یک سلول یا برای شناسایی توالی‌های DNA موجود در داخل

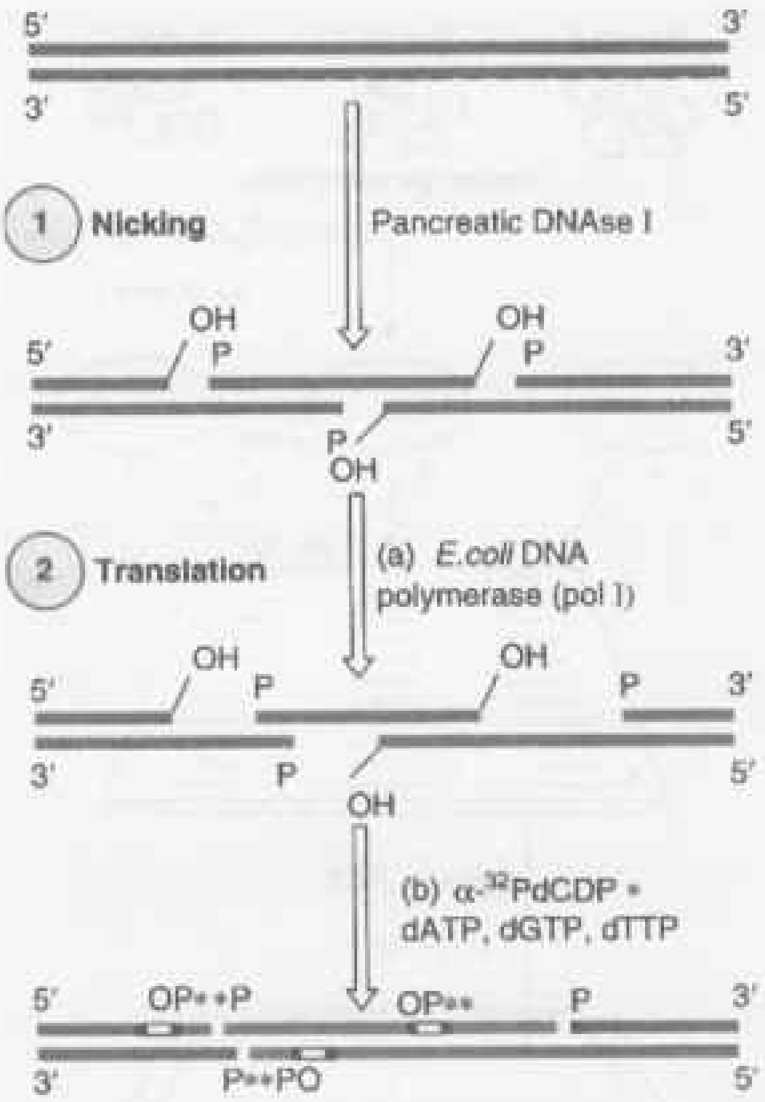
1. Lesch-Nyhan

یک ژنوم استفاده می‌شود. این پروب‌ها حاوی توالی‌های مکمل اسید نوکلئیک هدف هستند و با اسید نوکلئیک مورد نظر هیبرید می‌شوند. شدت اتصال پروب بستگی به شدت مکمل بودن دارد. لزومی ندارد که پروب کل توالی مکمل DNA را داشته باشد. پروب را می‌توان نشاندار نمود و برای این کار معمولاً از ^{32}P یا نشانگرهای غیررادیواکتیوی استفاده می‌شود که وابسته به سوبستراهای آنزیمی جفت‌شده با نوکلئوتیدها هستند که بعد از قرارگیری در داخل اسید نوکلئیک، با یک واکنش آنزیمی قابل جستجو می‌باشند.

پروب‌های نشاندار به طریق **انتقال بریدگی** DNA[1] دو-رشته تولید می‌شوند. جابه‌جایی بریدگی (شکل ۱۲-۷) مستلزم شکست تصادفی یک پیوند فسفودی‌استری در اسکلت یک رشته DNA توسط DNase I می‌باشد؛ این شکست را برش گویند. DNA پلیمراز I باکتری *E.coli* به‌واسطه فعالیت ′۵ ← ′۳ اگزونوکلئولیتیک و فعالیت DNA پلیمرازی خود، با هیدرولیز نوکلئوتیدها از سمت ′۵ برش، شکاف‌های تک-رشته‌ای را به‌وجود می‌آورد و سپس با فعالیت پلیمرازی خود این شکاف‌ها را پر می‌کند. این واکنش معمولاً در حضور یک dNTP نشاندار با $\alpha-{}^{32}P$ و سه dNTP غیرنشاندار دیگر انجام می‌شود. DNA مورد استفاده در این روش معمولاً خالص‌شده است و مشتق از DNA کلون‌شده، DNA ویروسی یا cDNA می‌باشد.

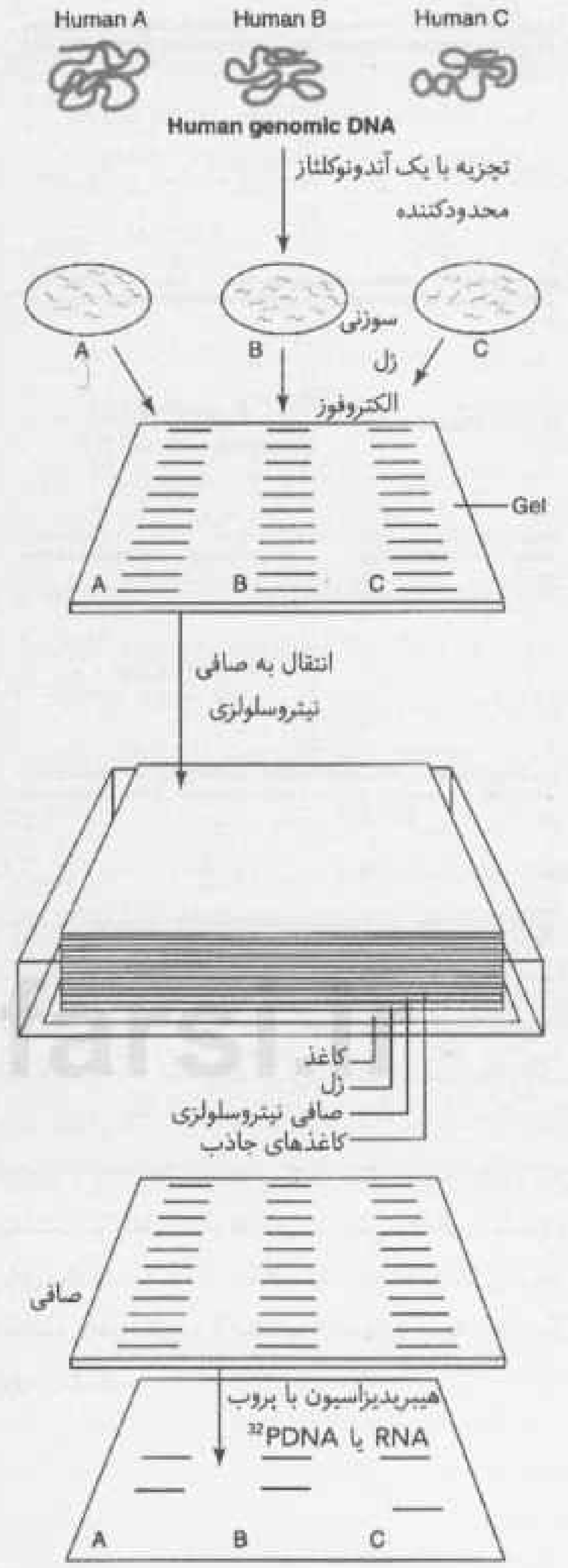
نشاندارسازی تصادفی پرایمر DNA[2] مزایای متفاوتی نسبت به روش انتقال بریدگی دارد. روش پرایمر تصادفی معمولاً نیاز به تنها 25 ng از DNA، در مقایسه با μg ۲-۱ برای جابه‌جایی بریدگی، دارد و منجر به نشاندارسازی پروب‌ها با یک فعالیت اختصاصی تقریباً ۱۰ برابر (بیش از cmp/ug 10^9) می‌شود. این روش عموماً تولید پروب‌های DNA نشاندار بلندتر می‌کند. پروب دو-رشته ذوب شده و با مخلوطی از هگزانوکلئوتیدهای حاوی تمامی توالی‌های احتمالی (ACTCGC، ACTCGA، و غیره) هیبرید می‌شود. هگزا-نوکلئوتیدهای هیبریدشده به‌عنوان پرایمر برای سنتز DNA توسط یک DNA پلیمراز، نظیر آنزیم کلنو، در حضور یک یا چند dNTP نشاندار با رادیواکتیو عمل می‌کنند.

پروب‌های RNA نشاندار مزایایی بر پروب‌های DNA دارند. اول، مقادیر زیاد RNA را می‌توان از الگویی رونویسی نمود که ممکن است به مقادیر بسیار محدودی وجود داشته باشد. لازم است قبل از هیبریدیزاسیون با DNA هدف، پروب DNA دو-رشته (dsDNA) دناتوره شود و هیبریدیزاسیون مجدد با خود، رقیب هیبریدیزاسیون با DNA مورد نظر است. رقابت مشابهی برای پروب‌های RNA تک-رشته‌ای وجود ندارد که با ملکول‌های DNA یا RNA مکمل هیبرید می‌شوند. برای سنتز پروب RNA نیاز به DNA به‌عنوان الگو می‌باشد. برای رونویسی لازم است این الگو به‌طور کووالان به یک پروموتر فرادست اتصال یابد که می‌تواند توسط یک RNA پلیمراز وابسته به DNA شناسایی شود. ناقلینی ساخته شده‌اند که بخوبی برای این تکنیک مناسب هستند.



شکل ۱۲-۷ انتقال بریدگی برای نشاندارسازی پروب‌های DNA. ملکول‌های DNA خالص‌شده را می‌توان با رادیواکتیو نشاندار و برای آشکارسازی وجود RNA یا DNA مکمل در نمونه‌های آزمایش به‌طریق هیبریدیزاسیون مورد استفاده قرار داد. (۱) مرحله ایجاد برش: ایجاد شکست‌های تک-رشته اتفاقی در DNA؛ (۲) مرحله جابه‌جایی: DNA پلیمراز *E.coli* (Pol I) هر دو فعالیت ′۳-′۵ اگزونوکلئازی برای برداشت نوکلئوتیدها از انتهای ′۵ برش و فعالیت پلیمرازی برای پرنمودن همزمان شکاف تک-رشته با نوکلئوتیدهای نشاندار رادیواکتیو و با استفاده از انتهای ′۳ به‌عنوان یک پرایمر را دارد.

1. Nick translation
2. Random primer labeling of DNA



شکل ۱۳-۷ ساترن بلات برای انتقال DNA از ژل به نیتروسلولز. انتقال DNA به نیتروسلولز، به صورت ملکول‌های تک-رشته، امکان جستجوی توالی‌های DNA اختصاصی در داخل یک مخلوط پیچیده از DNA را فراهم می‌سازد. از هیبریدیزاسیون با پروب‌های نشاندار حاصل از جابه‌جایی برش می‌توان برای بررسی وجود یک توالی DNA مورد نظر در همان نواحی یا نواحی متفاوت ژنوم استفاده نمود.

یک پروب DNA یا RNA نشاندار با اسیدهای نوکلئیک متصل به نیتروسلولز هیبرید شده و با جستجوی پروب نشاندار مورد شناسایی قرار می‌گیرد. اسیدهای نوکلئیک مورد نظر از کلونی‌های باکتریایی رشدکرده بر روی آگار یا از ژل‌های آگارزی که بر روی آنها به طریق الکتروفورتیک براساس اندازه جدا شده‌اند، انتقال داده می‌شوند.

تکنیک ساترن بلات برای تعیین‌هویت قطعات DNA

انتقال ملکول‌های DNAای که به طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز جدا شده‌اند، به یک صافی برای آنالیز، در دهه ۱۹۷۰ توسط ساترن[1] ابداع شد که یک ابزار ضروری است. این روش را **تکنیک ساترن بلات**[2] گویند (شکل ۱۳-۷). مخلوطی از قطعات حاصل از آندونوکلئاز محدودکننده را می‌توان براساس اندازه با الکتروفورز بر روی یک ژل آگارز جدا نمود. این قطعات DNA با خیساندن ژل در داخل قلیاء، دناتوره می‌شود. سپس ژل بر روی یک کاغذ جاذب قرار داده شده و یک صافی نیتروسلولزی مستقیماً بر روی ژل گذاشته می‌شود. کاغذ جاذب موجود در زیر ژل با یک محلول نمکی غلیظ مرطوب نگه داشته می‌شود که از میان ژل، نیتروسلولز و به‌داخل لایه‌های کاغذ جاذب بالا با عمل مویرگی کشانده می‌شود. سپس DNA با حرکت رو به بالای محلول نمک به‌داخل صافی نیتروسلولزی که در بالا قرار دارد کشانده شده و در آنجا اتصال می‌یابد. موقعیت DNA اتصال‌یافته به صافی نیتروسلولزی همانند موقعیت موجود در ژل آگارز است. DNA تک-رشته متصل به غشاء را می‌توان با استفاده از پروب‌های نشاندار آنالیز نمود.

تکنیک ساترن بلات برای جستجو و تعیین‌مقدار تعداد نسخه‌های توالی‌های خاص موجود در DNA ژنومی کمپلکس، جهت تأیید نتایج کلون‌سازی DNA و نشان‌دادن DNA چندشکلی در ژنوم انسان که با حالات پاتولوژیکی مرتبط است، با ارزش می‌باشد. مثالی از کاربرد ساترن بلات در شکل ۱۳-۷ نشان داده شده است. DNA ژنومی کامل انسان جداشده از سه فرد متفاوت، به‌طور مجزا با یک آندونوکلئاز محدودکننده هضم و تولید هزاران قطعه نمودند. این قطعات براساس اندازه در یک میدان الکتریکی در سرتاسر ژل آگارز جدا شدند. این قطعات به یک صافی نیتروسلولزی انتقال[3] (لکه‌گذاری[4]) و با یک پروب DNA یا RNA نشاندار با ^{32}P برای ژن مورد نظر هیبرید شدند. پروب مورد نظر دو باند را در هر سه فرد مشخص نمود که نشان می‌دهد ژن مورد نظر در یک جایگاه در داخل توالی آن شکسته شده است. افراد A و B الگوی طبیعی را نشان دادند، در حالی که بیمار C یک باند طبیعی و یک باند با وزن ملکولی کمتر را داشت. این مثالی از جستجوی قطعات DNA حاصل از آندونوکلئاز محدودکننده تغییریافته از افراد مختلف موجود در یک گونه، تحت عنوان **چندشکلی طول قطعه محدودکننده**[5] (RFLP)، می‌باشد. جستجوی

1. E. M. Southern
2. Southern blot technique
3. Transfered
4. Blotted
5. Restriction fragment length polymorphism

یک قطعه با وزن ملکولی کمتر در بیمار C به معنی آن است که حذف قطعه‌ای از ژن رخ داده است و این تغییر ممکن است با یک حالت پاتولوژیک مرتبط باشد. ژن این بیمار کلون، تعیین توالی و کاملاً آنالیز شد تا ماهیت تغییریافته این DNA مشخص گردد (ارتباط بالینی ۶-۷).

تکنیک‌های دیگری که از اصول ساترن بلات استفاده می‌کنند، شامل انتقال RNA (نورترن بلات[1]) و همان‌طور که در ادامه مورد بحث قرار خواهد گرفت، انتقال پروتئین‌ها (وسترن بلات[2]) به صافی‌های نیتروسلولزی یا غشاءهای نایلونی می‌باشند.

چندشکلی کونفورماسیونی تک- رشته

آنالیز ساترن بلات و جستجوی تغییرات بازی در DNA افراد مختلف یا آنالیز RFLP وابسته به تغییر در یک جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده می‌باشد. جایگزینی بازی، حذف و الحاق (**چندشکلی تک- نوکلئوتیدی[3] [SNP]**) به ندرت در یک جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده رخ می‌دهد. هرچند این تغییرات در یک جایگاه اختصاصی توسط **چندشکلی کونفورماسیونی تک- رشته[4] (SSCP)** آشکار می‌شوند. این تکنیک مزیت این واقعیت را دارد که DNA تک-رشته، با طول کمتر از ۴۰۰ باز، وقتی در ژل پلی‌آکریلامید در معرض الکتروفورز قرار می‌گیرد، با سرعتی حرکت می‌کند که تقریباً وابسته به کونفورماسیون آن می‌باشد. یک تغییر تک بازی معمولاً کونفورماسیون DNA را به اندازه‌ای تغییر می‌دهد که بتوان آن را به صورت یک تغییر حرکت در الکتروفورز بر روی یک ژل پلی‌آکریلامید فاقد دناتوره‌کننده آشکار نمود.

آنالیز یک ناحیه کوچک DNA ژنومی یا cDNA برای SSCP با ازدیاد ناحیه مورد نظر با PCR انجام می‌شود. پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی معنی و ضدمعنی سنتز شده که در طرفین ناحیه مورد نظر قرار گرفته و این ناحیه به طریق PCR در حضور نوکلئوتید(های) نشاندار با رادیواکتیو تکثیر داده می‌شود. سپس محصول دو-رشته نشاندار با رادیواکتیو و خالص‌شده PCR با حرارت در فرمامید ۸۰٪ با حرارت دناتوره شده و بلافاصله بر روی ژل پلی‌آکریلامید غیردناتوره‌کننده بارگیری می‌شود. حرکت‌های مربوط به محصولات کنترل با نمونه‌های مربوط به مطالعات تجربی یا بیماران مقایسه می‌شود. جستجوی جهش‌ها در نمونه‌های مربوط به بیماران، ضایعات ژنتیکی را تعیین‌هویت می‌کند. این روش‌های اجرایی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای آنالیز ژن‌های مربوط به سندرم QT طولانی مورد استفاده قرار گرفتند که در سندروم مرگ ناگهانی اطفال[5] (SIDS) نقش داشته‌اند (ارتباط بالینی ۷-۷ را ببینید). این روش وابسته به شناخت قبلی از توالی ژن یا قطعه ژنی مورد نظر است، در حالی آنالیز RFLP نیاز به تنها آنالیز نقشه محدودکننده DNA دارد.

1. Northern blot
2. Western blot
3. Single-nucleotide polymorphism
4. Single-strand conformation polymorphism
5. Sudden infant death syndrome

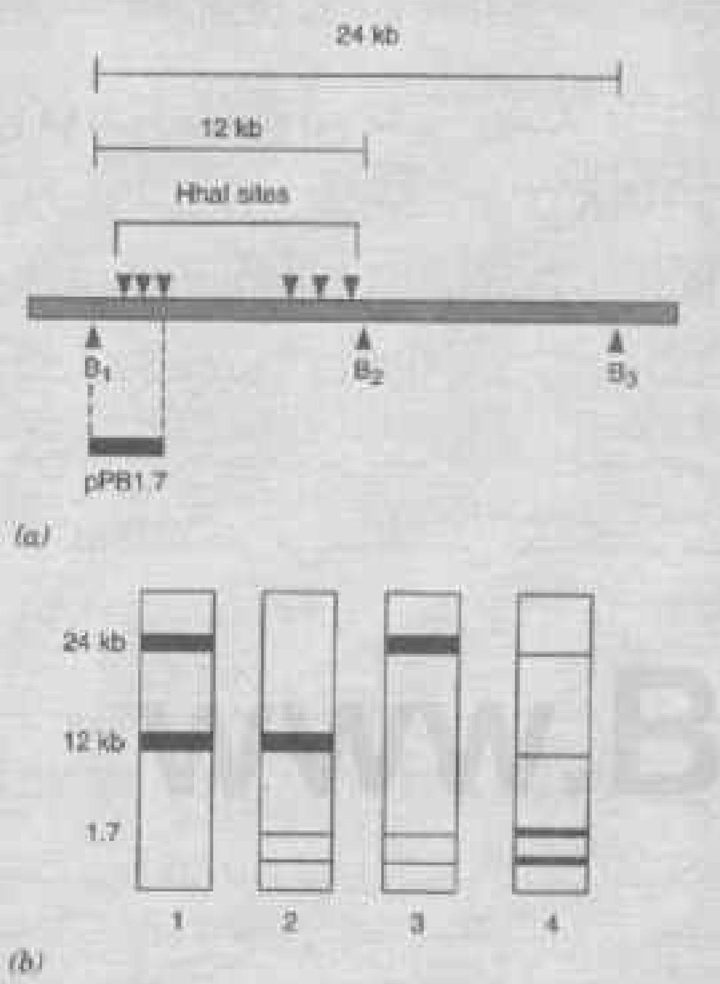
ارتباط بالینی ۶-۷

چندشکلی‌های طول قطعه محدودکننده، منشاء کلونال تومورها را تعیین می‌کنند

عموماً تصور می‌رود که اکثر تومورها منشاء منوکلونال دارند؛ یعنی، یک رخداد نادر یک ژنوم سلول پیکری را طوری تغییر می‌دهد که سلول‌ها امکان رشد غیرطبیعی به یک توده توموری را پیدا می‌کنند که در آن تمامی سلول‌های دختر ژنوم تغییریافته یکسانی را دارند. اثبات این که یک تومور از نوع منوکلونال یا پلی‌کلونال است، می‌تواند به تشخیص هیپرپلازی (افزایش تولید و رشد سلول‌های طبیعی) از نئوپلازی (رشد سلول‌های جدید یا توموری) کمک کند. جستجوی چندشکلی‌های طول قطعه محدودکننده (RFLPs) در نمونه‌های DNA لکه‌گذاری‌شده ساترن، امکان تعیین منشاء کلونال تومورهای انسانی را فراهم می‌سازد. در صورتی‌که سلول‌های توموری مجموعاً از سلول‌های والدینی مختلفی مشتق شده باشند، می‌بایست مخلوطی از مارکرهای DNA را داشته باشند که مشخصه هر کدام از منشاءهای سلولی هستند. هرچند، وجود یک مارکر DNA یکسان در تمامی سلول‌های توموری، یک منشاء منوکلونال را نشان خواهد داد. این آنالیز محدود به زنان با این مزیت می‌باشد که هر سلول تنها حاوی یک کروموزوم X فعال از منشاء پدری یا مادری همراه با کروموزوم X دوم غیرفعال می‌باشد. فعال‌سازی به‌طور اتفاقی طی آمبریوژنز رخ داده و به شکل صادقانه‌ای در تمامی سلول‌های دختر، با نیمی از سلول‌ها حاوی کروموزوم X فعال‌شده مادری و نیمه دیگر با کروموزوم X فعال‌شده پدری، حفظ می‌شود.

آنالیز ماهیت کلونال یک تومور بستگی به این واقعیت دارد که فعال‌سازی یک کروموزوم X مستلزم تغییراتی در متیلاسیون ریشه‌های سیتوزین (C) انتخاب‌شده در داخل ملکول DNA می‌باشد. چندین آندونوکلئاز محدود-کننده نظیر Hha I که DNA را در جایگاه‌های GCGC می‌شکند، در صورتی که C در داخل این جایگاه متیله شده باشد، DNA را در توالی‌های شناسایی خود نمی‌شکند. از اینرو، وضعیت متیله (فعال‌شده در برابر غیرفعال شده) کروموزوم X را می‌توان با آندونوکلئازهای محدودکننده پروب نمود. همچنین در تعداد قابل‌توجهی از افراد، به‌دلیل تفاوت‌های موجود در حرکت الکترو-فورتیک قطعات حاصل از آندونوکلئاز محدودکننده مشتق از نواحی انتخابی کروموزوم، کروموزوم X پدری را می‌توان از کروموزوم X مادری تمایز داد. این قطعات بر روی یک لکه ساترن به طریق هیبریدیزاسیون با یک پروب DNA شناسایی می‌شوند که مکمل این ناحیه کروموزوم X می‌باشد. یک ژن وابسته به X که مناسب این مطالعات بود، ژن هیپوگزانتین گوانین فسفو-ریبوزیل‌ترانسفراز (HGPRTase) می‌باشد. ژن HGPRTase دو جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده Bam HI (B1 و B3 در شکل) دارد، ولی در برخی افراد جایگاه سومی (B2) نیز وجود دارد.

وجود جایگاه B2 تنها در یک کروموزوم X پدری HGPRT امکان جستجوی RFLPs را فراهم می‌سازد. لذا یک سلول مؤنث ممکن است یک کروموزوم X با ژن HGPRT حاوی جایگاه‌های 2Bam HI (منجر به تولید یک قطعه DNA با ۲۴ kb) یا جایگاه‌های 3Bam HI (منجر به تولید یک قطعه DNA قابل‌جستجوی *kb* ۱۲) باشد. این شکل، نتایج مورد انتظار حاصل از آنالیز DNA سلول توموری در جهت تعیین منشاء منوکلونال یا پلی‌کلونال آن را نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رفت، سه تومور انسانی که با این روش مورد بررسی قرار گرفتند، منشاء منوکلونال داشتند.



آنالیز DNA ژنومی در جهت تعیین منشاء کلونال تومورها. (a) ژن هیپوگزانتین گوانین فسفوریبوزیل‌ترانسفراز (HGPRTase) دو جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده Bam HI ثابت (B1 و B3) دارد، در حالی در برخی افراد جایگاه سومی، یعنی B2، نیز وجود دارد. این ژن همچنین حاوی چندین جایگاه Hha I است؛ هرچند، تمامی این جایگاه‌ها، به غیر از HI، معمولاً در کروموزوم X فعال متیله هستند. جایگاه HI برای تجزیه توسط Hha I تنها در کروموزوم X فعال در دسترس خواهد بود. یک پروب کلون‌شده نشاندار pPB1.7 برای تعیین اینکه کدام شکل ژن HGPRTase در یک تومور وجود دارد، در صورتی‌که بر روی کروموزوم X فعال وجود داشته باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرد. (b) الگوهای آندونوکلئاز محدودکننده پیش‌بینی شده برای تومورهای منوکلونال در مقابل پلی‌کلونال به‌صورت زیر است: (۱) تجزیه فقط با Bam HI. یک قطعه ۲۴ kb مشتق از یک ژن حاوی تنها جایگاه‌های B1 و B3 و قطعه ۱۲ kb مشتق از یک ژن حاوی جایگاه B2 اضافی. این الگو مشخصه فرد هتروزیگوس است. (۲) تجزیه توسط Bam HI به علاوه Hha I، تومور منوکلونال با ۱۲ kb مشتق از یک کروموزوم X فعال (متیله). (۳) شکسته‌شده با Bam HI و Hha I، تومور منوکلونال با قطعه ۲۴ kb مشتق از یک کروموزوم X فعال (متیله). (۴) شکسته‌شده با Bam HI و Hha I، تومور پلی‌کلونال. همه تومورهای مطالعه شده الگوهایی همانند ردیف ۲ و ردیف ۳ را نشان دادند.

ارتباط بالینی ۷-۷

چندشکلی کونفورماسیونی تک-رشته برای جستجوی جهش‌های خود به خودی که ممکن است منجر به SIDS شوند

سندرم مرگ ناگهانی اطفال[1] (SIDS) یک علت اصلی مرگ طی اولین سال زندگی در ایالات متحده است. مطالعه آینده‌نگر بیش از ۳۴۰۰۰ نوزاد که به طریق الکتروکاردیوگرافی زیر نظر قرار داشتند، یک ارتباط قوی بین افزایش خطر SIDS و افزایش فاصله QT را در EKG آنها نشان داد. براساس این مطالعه، تصمیم به جستجوی یک جهش در یک یا چند ژن شناخته‌شده مرتبط با سندروم QT طولانی در یک طفل ۴۴ روزه گرفته شد که به صورت سیانوتیک، آپنیک و فاقد نبض به اورژانس بیمارستان آورده شد. آریتمی این کودک همراه با فاصله QT طولانی با DC شوک‌های الکتریکی متعدد و به دنبال آن درمان دارویی تثبیت شد. DNA ژنومی از لنفوسیت‌های خون محیطی از این طفل و والدینش تهیه شد. یک ژن همراه با سندروم QT طولانی حاوی جایگزینی AAC به جای TCC در موقعیت ۲۹۷۱ تا ۲۹۷۳ (پروتئین مرتبط با کانال سدیمی) کودک بود، ولی این جایگزینی در نمونه DNA والدین یافت نشد. در اثر این جهش، یک ریشه سرین با یک آسپاراژین در یک ناحیه شدیداً حفظ شده پروتئینی جایگزین شده بود که تصور می‌رود این پروتئین در عملکرد کانال سدیمی نقش دارد. این جهش در ۲۰۰ فرد شاهد یافت نشد. لذا نتیجه‌گیری شد که این کودک دچار یک جهش خودبه‌خودی در ژنی شده بود که با فاصله QT طولانی ارتباط داشت و این جهش منجر به یک رخداد SIDS-مانند شده بود. بعد از درمان، این کودک برای تقریباً ۵ سال بدون علامت بود. این مطالعه اشاره به ارزش بالقوه غربالگری الکتروکاردیوگرافیکی نوزادان در جهت کاهش مرگ و میر اطفال به دلیل SIDS دارد.

1. Sudden infant death syndrome

جستجوی mRNA

آنالیز میزان انواع mRNA موجود در بافت یا کل فرآورده‌های RNA اغلب برای شناخت ما از تنظیم ژنی رشد سلولی و تمایز بافتی مهم می‌باشد. ما می‌توانیم زمان‌بندنی، میزان و محل بیان ژن در داخل بافت را از طریق آنالیز انواع اختصاصی mRNA ارزیابی کنیم. تکنیک‌های متعددی برای ارزیابی میزان یک نوع اختصاصی mRNA در یک فراورده RNA، در دسترس قرار دارند. **(a) آنالیز نورترن بلات** نیاز به جداسازی انواع RNA، براساس اندازه، با الکتروفورز بر روی ژل آگارز و سپس انتقال و اتصال به یک غشاء در تکنیک ساترن بلات دارد. در ادامه انواع RNA ثابت‌شده با یک پروب نشاندار هیبرید می‌شوند که برای نوع mRNA موردنظر اختصاصی است. در صورتی‌که این پروب با رادیواکتیو نشاندار شده باشد، هیبریدها با اتورادیوگرافی مورد جستجو قرار می‌گیرند. پروب‌های غیررادیواکتیو نیز در دسترس قرار دارند. آنالیز نورترن بلات به‌راحتی امکان تعیین اندازه mRNA و تعیین هویت رونوشت‌های با اسپلایسینگ احتمالاً متفاوت و یا وجود رونوشت‌های خانواده چند ژنی را فراهم می‌سازد. **(b) RT-PCR** (قسمت ۸-۷)، برخلاف نورترن بلات، به ما این امکان را می‌دهد تا بتوانیم میزان یک گونه mRNA موجود در یک نمونه RNA را اندازه‌گیری کنیم. اندازه‌گیری براساس مقایسه میزان نسبی محصول PCR یک رونوشت کنترل داخلی با میزان یک mRNA اختصاصی موجود در نمونه می‌باشد. رونوشت‌های کنترل شاخص شامل GAPDH (گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز) و β-اکتین می‌باشند. **(c) آزمون حفاظت نوکلئاز**[1] (NPA) اطلاعاتی در خصوص اندازه mRNA موردنظر فراهم

1. Nuclease protection assay

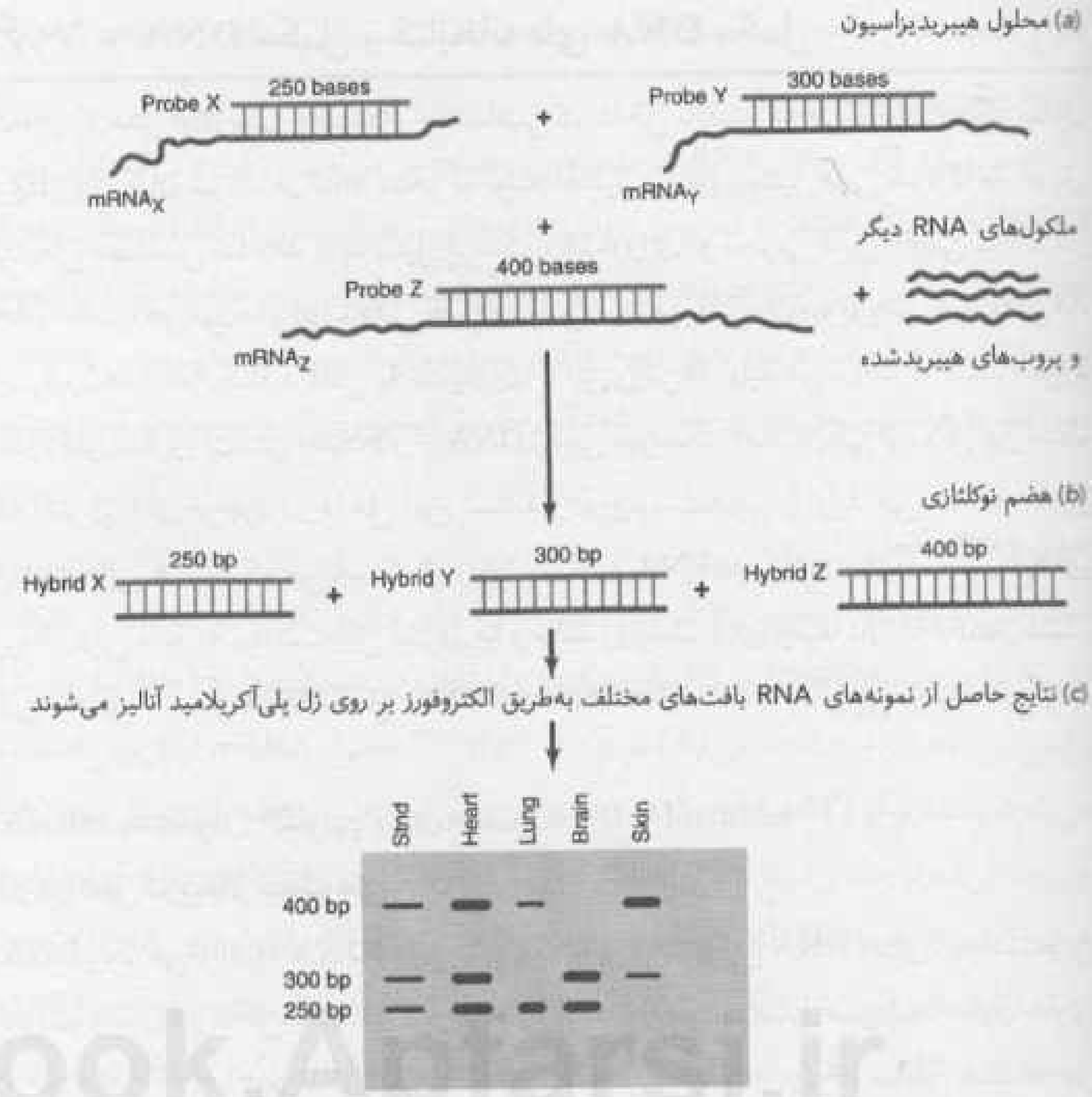
نمی‌کند، ولی به‌طور ایده‌آل برای آنالیز همزمان چند نوع mRNA مناسب است. پروب(های) نشاندار با رادیواکتیو و یا غیرایزوتوپی با نمونه RNA موجود در محلول هیبرید می‌شود. هیبریدیزاسیون در محلول کارآمدتر از هیبریدیزاسیون با RNA ثابت شده بر روی غشاء، همانند حالت مورد استفاده در نورترن بلات‌ها، می‌باشد. سپس مخلوطی از انواع هیبرید-شده در میان یک ژل آکریلامید درصد پایین (۶٪) جدا می‌شود. اندازه هر نوع هیبرید براساس اندازه پروب انتخابی تعیین می‌شود. NPA معمولاً برای جستجوی رونوشت‌های RNA مربوط به بافت‌های متفاوت مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۱۴-۷). (d) **هیبریدیزاسیون درجا**[1] تنها روشی است که در این قسمت برای تعیین سلول‌هایی در نمونه بافت ثابت‌شده با فرمالین شرح داده می‌شود که یک ژن اختصاصی را بیان می‌کنند. در این روش، RNA جدا نشده و یا در معرض جداسازی الکتروفورتیک قرار نمی‌گیرد. در عوض بافت‌های مورد نظر ثابت می‌شوند، برش نازک از آنها تهیه می‌گردد و بر روی اسلایدهای میکروسکوپی پوشانده می‌شوند. پروتئین‌ها با پروتئاز K هضم می‌شوند تا دسترسی پروب رادیواکتیو برای هیبریدیزاسیون با mRNA سلولی مورد نظر افزایش یابد. این روش از یافته‌های مربوط به آزمون‌های حفاظت نوکلئاز حمایت می‌کنند و همچنین مشخص می‌کند کدام انواع سلول‌های موجود در داخل بافت‌ها، در حال بیان mRNA مورد نظر هستند.

جستجوی پروتئین‌های اتصالی به توالی- اختصاصی DNA

پروتئین‌های تنظیمی به توالی‌های اختصاصی از DNA اتصال می‌یابند که در طرفین ژن‌ها قرار دارند و سبب تنظیم افزایشی یا کاهشی بیان ژن می‌شوند. روش آزمون شیفت حرکت الکتروفورتیک[2] (EMSA)، یا تأخیر ژلی[3] به‌طور گسترده‌ای برای آنالیز پروتئین‌های اتصالی به توالی‌های اختصاصی DNA همراه با توالی DNA مورد نیاز برای اتصال، مورد استفاده قرار گرفته است. پروتئین‌های دارای خصوصیات بالقوه اتصال به DNA از عصاره‌های سلول کامل، عصاره‌های هسته، فرآورده‌های پروتئینی تخلیص‌شده یا پروتئین‌های نوترکیب حاصل از سیستم‌های بیانی که به طریق ژنتیکی مهندسی شده‌اند، تهیه می‌گردند. پروب DNA با رادیواکتیو نشاندار می‌شود. DNA انتخاب‌شده ممکن است قطعات DNA، اولیگونوکلئوتیدهای سنتتیک دو-رشته، یا DNA کلون‌شده حاوی جایگاه(های) اتصال به پروتئین شناخته‌شده یا جایگاه(های) اتصال به پروتئین بالقوه باشند. این DNA می‌بایست دو رشته باشد، زیرا DNA تک-رشته به پروتئین‌های اتصال به تک-رشته غیراختصاصی (با عصاره‌های سلولی یا هسته‌ای) اتصال می‌یابد که با تفسیر نتایج تداخل خواهد کرد. پروب DNA نشاندار تخلیص‌شده و نمونه پروتئین از قبل انکوبه شده تا قبل از انجام آنالیز الکتروفورتیک نمونه، تولید یک کمپلکس DNA-پروتئین پایدار شود.

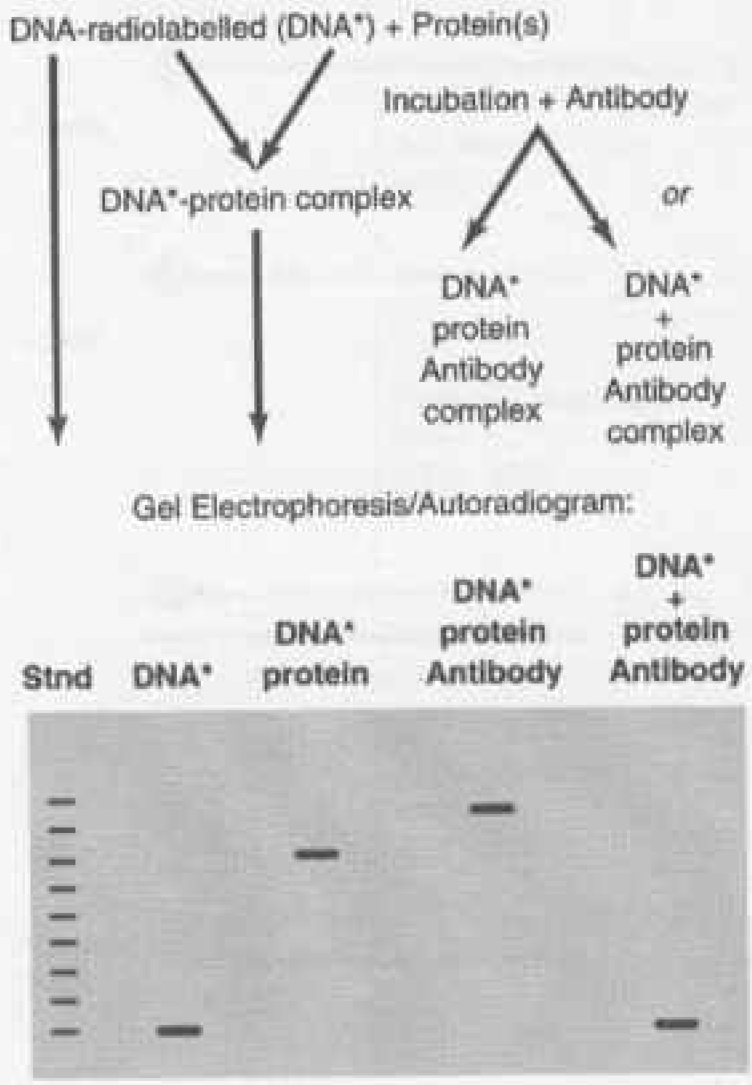
شکل ۱۵-۷ به‌طور شماتیک نتایج مورد انتظار را برای کمپلکس‌های DNA رادیواکتیو-

1. In situ hybridization
2. Electrophoretic mobility shift assay
3. Gel retardation



شکل ۱۴-۷ آزمون حفاظت نوکلئازی. کل mRNA سلولی را می‌توان از بافت‌های مختلف جدا نمود. پروب‌های DNA تک-رشته که مکمل توالی‌های شناخته‌شده مربوط به رونوشت‌های ژنی مختلف هستند (mRNAx، mRNAy، mRNAz)، با مخلوط RNA هیبرید می‌شوند. هضم نوکلئازی با یک ریبونوکلئاز سبب هیدرولیز نواحی RNA تک-رشته mRNA هیبریدنشده با پروب DNA و تمامی انواع RNAهای هیبرید نشده می‌شود. تنها هیبریدهای DNA-RNA که در برابر فعالیت نوکلئازی محافظت شده‌اند، برای آنالیز به طریق الکتروفورز بر روی ژل آکریلامید باقی خواهند ماند. سپس به‌راحتی می‌توان بیان تمایزی ژن‌ها در بافت‌های اختصاصی را مشاهده نمود.

نشاندار با یک پروتئین را نشان می‌دهد که منجر به تأخیر در حرکت آن در میان ژل، در مقایسه با DNA تعامل‌نکرده، می‌شود. در صورتی که قبل از انکوباسیون، آنتی‌بادی ضد پروتئین اتصال به DNA مورد نظر به لوله اضافه گردد، یکی از دو واکنش احتمالی رخ می‌دهد. در صورتی‌که این آنتی‌بادی به اپی‌توپی متصل شود که مانع اتصال پروتئین به DNA نشود، اندازه کمپلکس افزایش‌یافته که نتیجه آن **ابرتغییر**[1] (یا تأخیر بیشتر) در حرکت ژلی می‌باشد. برعکس، در صورتی‌که آنتی‌بادی جایگاه اتصال به DNA پروتئین را مسدود کند، یک کمپلکس پروتئین-آنتی‌بادی تشکیل شده و حرکت پروب DNA نشاندار در ژل تغییر نخواهد کرد. در هر صورت، نتیجه حاصل از آنتی‌بادی، هویت پروتئین اتصالی-DNA را تأیید خواهد نمود.



شکل ۱۵-۷ آزمون تغییر حرکت الکتروفورتیک. DNA خالص‌شده وقتی در معرض یک میدان الکتریکی قرار می‌گیرد، براساس بار و جرم ملکولی خود در میان یک ژل حرکت می‌کند. در صورتی‌که یک پروتئین (یا پروتئین‌هایی) به آن اضافه شود (شوند)، DNA خالص‌شده ممکن است با آن ایجاد کمپلکس کند و جرم ملکولی ظاهری کل افزایش یابد. نتیجه کاهش حرکت در میان ژل می‌باشد- یک تغییر حرکتی. افزودن یک آنتی‌بادی که با پروتئین کمپلکس شده با DNA واکنش می‌کند، ولی تداخلی در تعامل DNA-پروتئین به‌وجود نمی‌آورد، سبب افزایش بیشتر اندازه کمپلکس DNA- پروتئین شده و حرکت آن را بیشتر کاهش می‌دهد. در صورتی‌که این آنتی‌بادی با ناحیه اتصال به DNA پروتئین واکنش کند، دیگر کمپلکس DNA-پروتئین به‌وجود نمی‌آید. در هر دو حالت، آنتی‌بادی به شناسایی پروتئین اتصالی DNA کمک خواهد نمود.

1. Supershift

۶-۷ • DNA مکمل و کتابخانه‌های DNA مکمل

الحاق ژن‌های اوکاریوتی وظیفه‌دار اختصاصی در داخل ناقلینی که می‌توانند در یک سلول پروکاریوتی بیان شوند، می‌تواند منجر به تولید مقادیر زیادی پروتئین‌هایی شود که به طریق ژنتیکی مهندسی شده‌اند و پتانسیل پزشکی، کشاورزی، و تجربی قابل‌توجهی دارند. در حال حاضر، هورمون‌ها و آنزیم‌هایی نظیر انسولین، اریتروپویتین، ترومبوپویتین، اینترلوکین‌ها، اینترفرون‌ها و فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن، با این روش‌ها تولید می‌شوند. به استثناء موارد نادر، کلون‌سازی ژن‌های وظیفه‌دار از DNA ژنومی غیرممکن است. یکی از دلایل این است که اکثر ژن‌های موجود در داخل ژنوم پستانداران رونوشت‌هایی را تولید می‌کنند که حاوی اینترون‌هایی هستند که می‌بایست از رونوشت اولیه mRNA برداشت شوند. سیستم‌های پروکاریوتی قادر به برداشت این اینترون‌ها و تولید رونوشت‌های وظیفه‌دار mRNA نیستند. این مشکل با سنتز **DNA مکمل**[1] **(cDNA)** از mRNA وظیفه‌دار اوکاریوتی برطرف می‌گردد.

mRNA به عنوان الگویی برای سنتز DNA با استفاده از ترانس‌کریپتاز معکوس

RNA پیک می‌تواند به cDNA رونویسی معکوس شده و این cDNA برای ازدیاد، تعیین هویت و بیان در داخل یک ناقل قرار داده شود. به‌طور طبیعی سلول‌های پستانداران حاوی ۱۰,۰۰۰–۳۰,۰۰۰ نوع ملکول mRNA مختلف در هر زمان از چرخه سلولی هستند. هر چند در برخی موارد، احتمال دارد یک نوع mRNA اختصاصی، برای مثال mRNA گلوبین در رتیکولوسیت‌ها، به حدود ۹۰٪ کل ملکول‌های mRNA برسد. در حالت طبیعی، بسیاری از ملکول‌های mRNA تنها تعداد کمی (۱۴–۱) نسخه در هر سلول دارند. یک کتابخانه cDNA را می‌توان از کل mRNA سلولی ساخت، ولی وقتی تنها چند نسخه از mRNA مورد نظر در هر سلول وجود داشته باشد، آنگاه ممکن است تعیین هویت cDNA آن بسیار مشکل باشد. روش‌هایی که سبب غنی‌سازی جمعیت ملکول‌های mRNA یا cDNA مربوطه آنها می‌شوند، امکان کاهش تعداد انواع cDNAهای مختلف موجود در یک کتابخانه cDNA را فراهم ساخته و به‌موجب آن احتمال تعیین‌هویت کلون موردنظر را به میزان زیادی افزایش می‌دهد.

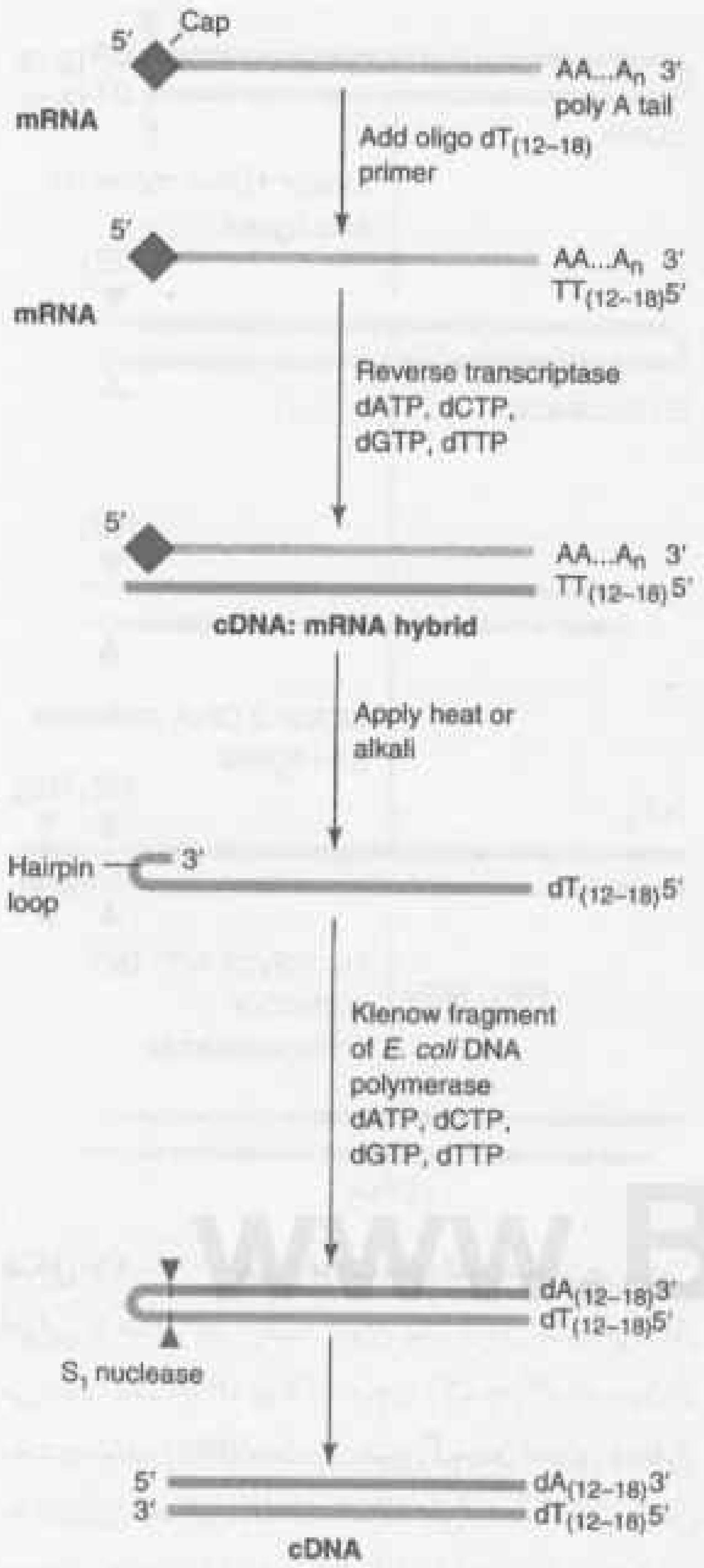
mRNA موردنظر با تکنیک‌های جداسازی تغلیظ می‌شود

RNA پیک را می‌توان با الکتروفورز بر روی ژل یا سانتریفوژ براساس اندازه جدا نمود. جداسازی mRNA در یک دامنه اندازه ملکولی اختصاصی یک mRNA مورد نظر را تا چند برابر غنی می‌سازد. دانستن وزن ملکولی پروتئینی که توسط ژن مورد نظر کد می‌شود، معیاری بـرای برآورد اندازه تقریبی رونـوشت mRNA یا cDNA آن می‌باشد؛ هرچند به

1. Complementary DNA

دلیل تفاوت‌های موجود در طول توالی‌های ترجمه‌نشونده ملکول‌های mRNA، تنوع در اندازه پیش‌بینی‌شده حاصل می‌شود.

غنی‌سازی یک ملکول mRNA اختصاصی را همچنین می‌توان با یک روش ایمونولوژیکی انجام داد، ولی برای آن نیاز به دسترسی به آنتی‌بادی‌هایی برعلیه پروتئین کدشده توسط ژن مورد نظر می‌باشد. آنتی‌بادی‌های اضافه‌شده به یک مخلوط سنتز پروتئین در لوله آزمایش، با زنجیر پلی‌پپتیدی در حال رشد مرتبط با پلی‌زوم‌ها واکنش نموده و آن را رسوب می‌دهد. سپس mRNA مورد نظر از فراکسیون پلی‌زومی جدا می‌شود که به طریق ایمونولوژیکی رسوب داده شده است.



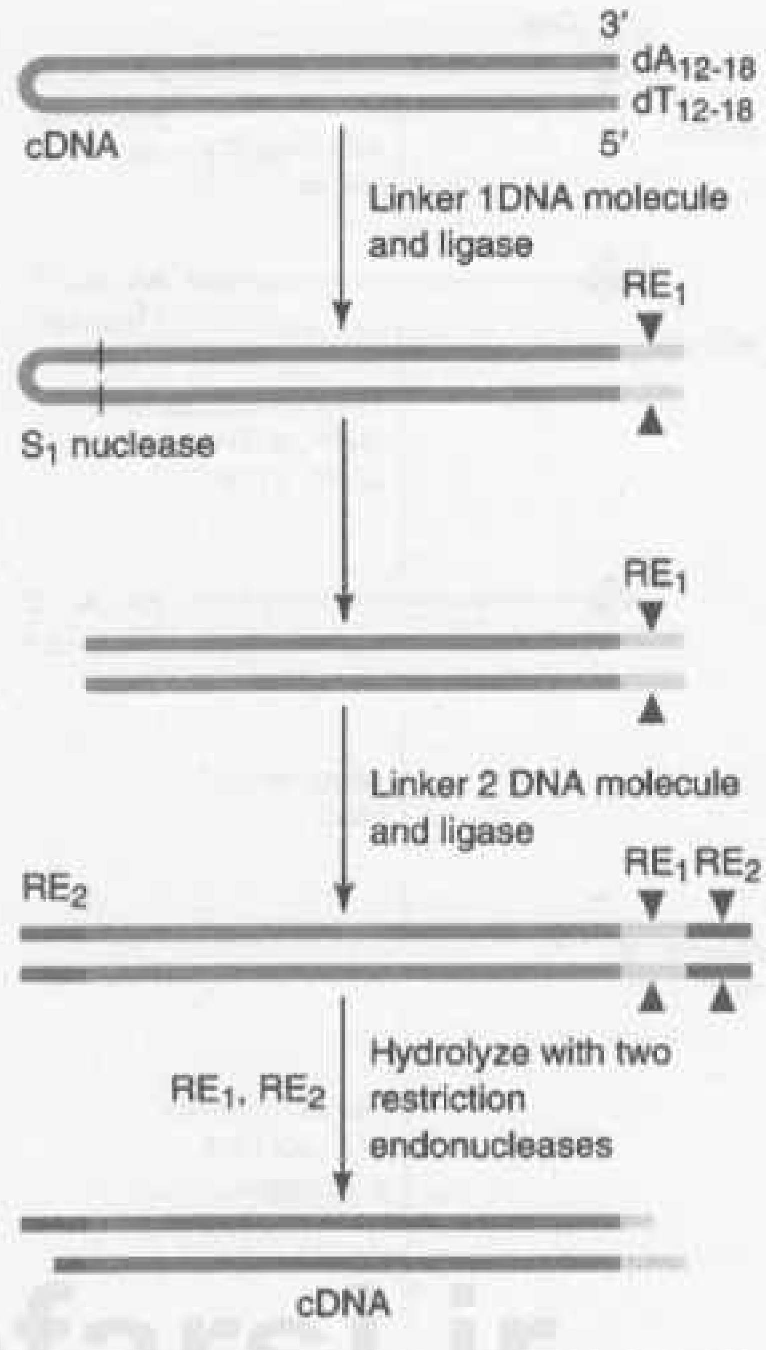
شکل ۱۶-۷ سنتز cDNA از mRNA. دم پلی (A) انتهای ۳′ ملکول mRNA با یک اولیگومر dT (oligo[dT012-18]) هیبرید می‌شود. این دم به عنوان پرایمر برای ترانس‌کریپتاز معکوسی عمل می‌کند که سنتز رشته DNA مکمل (cDNA) را در حضور چهار داکسی‌ریبونوکلئوتید تری‌فسفات (dNTPs) کاتالیز می‌کند. هیبرید cDNA:mRNA حاصل از طریق ذوب حرارتی یا هیدرولیز mRNA در قلیا، به cDNA تک-رشته تبدیل می‌شود. انتهای ۳′ ملکول cDNA یک قوس سنجاقی به وجود می‌آورد که به عنوان یک پرایمر برای سنتز رشته دوم DNA توسط قطعه کِلنو DNA پلیمراز *E.coli* عمل می‌کند. قوس DNA تک-رشته جفت‌نشده توسط نوکلئاز S1 هیدرولیز شده تا یک ملکول DNA دو-رشته حاصل شود.

سنتز DNA مکمل

مخلوطی از mRNA به عنوان الگو برای سنتز رشته‌های مکمل DNA با استفاده از DNA پلیمراز وابسته به RNA، ترانس‌کریپتاز معکوس، استفاده می‌شود (شکل ۱۶-۷). نیاز به یک پرایمر می‌باشد؛ از مزیت دم پلی (A) موجود در انتهای ۳′ ملکول mRNA اوکاریوتی استفاده می‌شود. یک اولیگو (dT) با ۱۸-۱۲ باز به عنوان پرایمر انتخاب شده که با این توالی پلی (A) هیبرید می‌شود. بعد از سنتز cDNA، این هیبرید دناتوره شده و یا mRNA در شرایط قلیایی هیدرولیز می‌شود تا cDNA تک-رشته حاصل شود. انتهای ۳′ ملکول‌های cDNA تک-رشته تولید یک قوس سنجاقی می‌کند که به‌عنوان یک پرایمر برای سنتز رشته دوم cDNA توسط قطعه کِلنو یا یک ترانس‌کریپتاز معکوس مورد استفاده قرار می‌گیرد. DNA دو-رشته حاصل حاوی یک قوس تک-رشته است که توسط S1 نوکلئاز شناسایی و هضم می‌شود. قبل از کلون‌سازی در این ناقل، لازم است دو انتهای cDNA تغییر داده شود. در یکی از روش‌ها، ملکول‌های cDNA دارای انتهای صاف با ملکول‌های رابط و یک DNA لیگاز باکتریوفاژ T4 انکوبه می‌شوند که اتصال ملکول‌های دارای انتهای صاف را کاتالیز می‌کند (شکل ۱۷-۷). ملکول‌های رابط سنتتیک حاوی جایگاه‌های مربوط به آندونوکلئازهای محدودکننده هستند که حالا توسط آنزیم مناسبی برای الحاق این cDNA در داخل یک ناقل شکسته شده توسط همان آندونوکلئاز، شکسته می‌شود.

DNA باکتریوفاژ (ص ۳۸۴) مناسب‌ترین و مؤثرترین ناقل برای تولید کتابخانه cDNA است، زیرا به راحتی می‌توان آنها را تکثیر داد و به مدت بی‌نهایت نگهداری نمود. برای تولید کتابخانه‌های cDNA از دو ناقل باکتریوفاژی، **λgt10** و **λgt11**، و ساخته‌های[1] جدیدتر آنها استفاده می‌شود. وقتی توالی‌های DNA مورد نظر ناشناخته می‌باشد، کتابخانه‌های cDNA در λgt10 تنها با پروب‌های اسید نوکلئیک نشاندار غربال می‌شوند، در حالی که انواع موجود در λgt11، یک **ناقل بیانی**، را می‌توان با آنتی‌بادی ضد پروتئین تولیدی یا آنتی ژن مورد نظر غربال نمود. در صورتی که توالی cDNA مورد نظر مشخص باشد، آنگاه از PCR برای غربال باکتریوفاژ نوترکیب استفاده می‌شود.

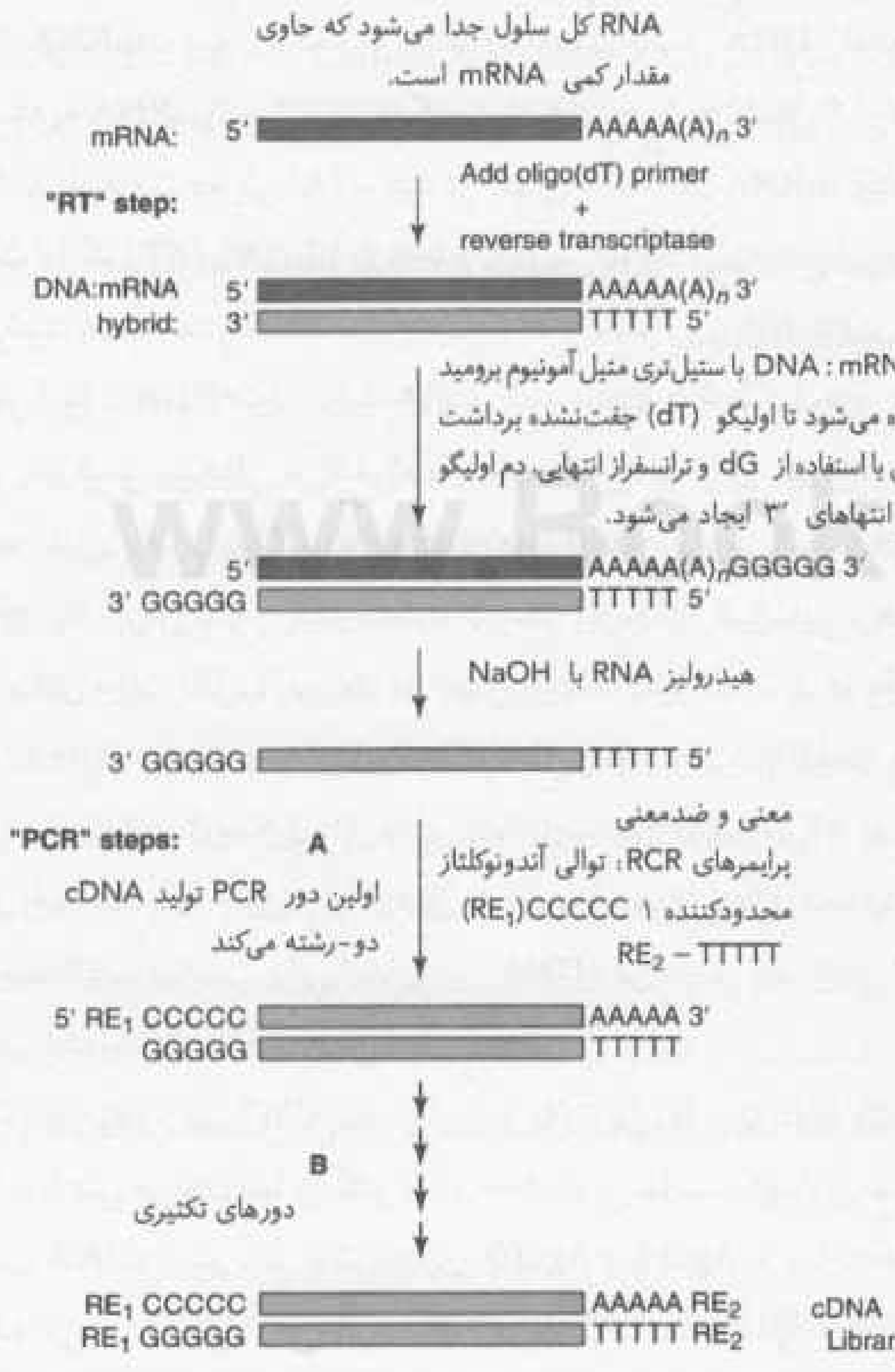
1. Constructs



شکل ۱۷-۷ **تغییر cDNA برای کلون‌سازی.** این روش اجرایی با DNA دو-رشته حاوی یک قوس سنجاقی آغاز می‌شود. یک DNA رابط که حاوی یک جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده (RE1) است، از طریق گره‌زدن انتهای همطراز به انتهای آزاد این cDNA اضافه می‌گردد. سپس قوس سنجاقی تک-رشته توسط نوکلئاز S1 هیدرولیز می‌شود. رابط دوم با یک آندونوکلئاز محدودکننده متفاوت در داخل (RE2)، به انتهای همطراز cDNA آزاد تازه‌ساخته‌شده دوخته می‌شود. این رابط دوم احتمالاً به هر دو انتها اتصال می‌یابد، ولی با جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده اول تداخل نمی‌کند. DNA تغییریافته با دو آندونوکلئاز محدودکننده هیدرولیز شده و می‌توانند به طریق کلون‌سازی جهت‌دار در داخل یک پلاسمید یا DNA باکتریوفاژ قرار داده شود.

RNA کل سلول به عنوان الگو برای سنتز DNA با استفاده از RT-PCR

در روش‌های دیگر ساختن کتابخانه‌های cDNA، از تکنیک **PCR- ترانس‌کریپتاز معکوس (RT-PCR)** استفاده می‌شود. دیگر نیازی به تخلیص mRNA نمی‌باشد. یکی از این راهکارها در شکل ۱۸-۷ شرح داده شده است و با تولید یک هیبرید DNA-RNA توسط ترانس کریپتاز معکوس آغاز می‌شود. در این روش از ترانسفراز انتهایی برای افزودن دم هُموپلیمر dG به انتهای ۳′ و به دنبال آن هیدرولیز mRNA استفاده می‌شود. پرایمرهای PCR برای ایجاد هیبرید با دم‌های dG و dA و خاتمه با دو توالی مختلف آندونوکلئاز محدودکننده سنتز می‌شوند. سپس cDNAحاصل که به طریق PCR ازدیادیافته است، با دو آندونوکلئاز



شکل ۱۸-۷ **تولید cDNA به طریق PCR- ترانس‌کریپتاز معکوس (RT-PCR).** mRNA یا RNA کل سلول را می‌توان برای تولید cDNA توسط RT-PCR مورد استفاده قرار داد. mRNA با یک دم اولیگو rA به یک پرایمر اولیگو dT رونویسی معکوس می‌شود. یک دم اولیگو dG به انتهای ۳′ رشته‌های RNA و DNA اضافه می‌شود، و رشته RNA بعداً با NAOH هیدرولیز می‌گردد. سپس از پرایمرهای معنی و ضدمعنی، تغییریافته با توالی‌های جایگاه محدودکننده، برای تکثیر cDNA به طریق PCR استفاده می‌شود. محصولات می‌توانند توسط آندونوکلئازهای محدودکننده اختصاصی (RE1 و RE2) جهت کلون‌سازی و مطالعات بعدی هیدرولیز شوند.

محدودکننده مختلف برای کلون‌سازی جهت‌دار (ص. ۳۵۸) در داخل یک ناقل مناسب، هیدرولیز می‌شود.

۷-۷ • ناقلین کلون‌سازی باکتریوفاژی، کاسمیدی و مخمری و آنالیز قطعات بزرگ DNA

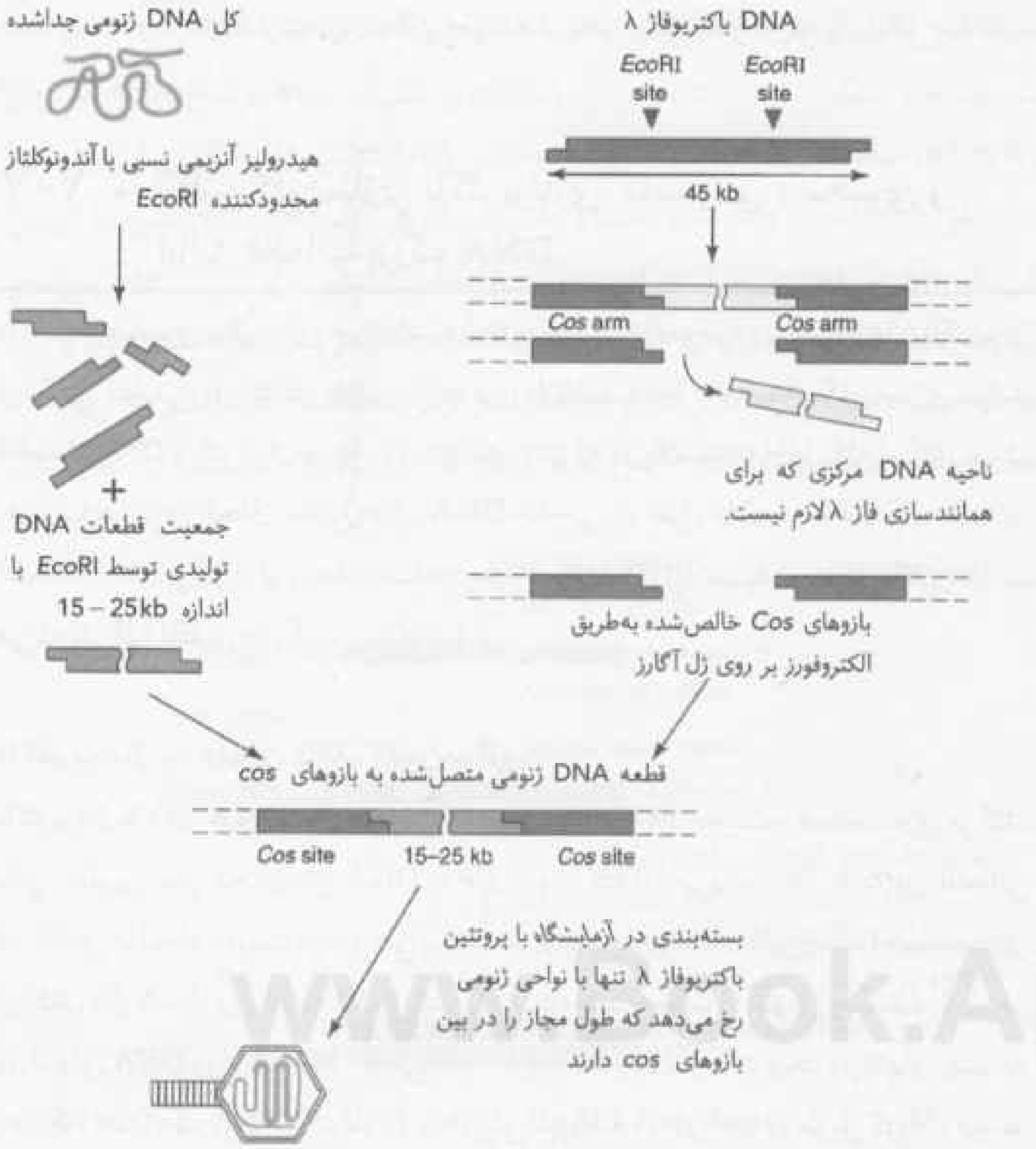
به دلیل جستجوی توالی‌های غیرکدکننده (یعنی، اینترون‌ها) موجود در اکثر ژن‌های اوکاریوتی و نواحی تنظیمی دور که در طرفین ژن‌ها قرار دارند، لازم بود راهکارهای کلون‌سازی بتوانند قطعات DNA بزرگتر از آن چیزی را بسته‌بندی کنند که در پلاسمیدها قابل کلون‌سازی بودند. پلاسمیدها برای الحاق ملکول‌های DNA خارجی به طول ۱۰kb-۵ مناسب هستند. قطعات DNA بزرگتر از این به‌طور تصادفی طی همانندسازی پلاسمید در داخل باکتری حذف می‌شوند. لذا ناقلین جایگزین ابداع شدند.

باکتریوفاژ به عنوان ناقل کلون‌سازی

باکتریوفاژ λ (فاژ λ) به عنوان ویروسی که در باکتری‌ها ایجاد عفونت و همانندسازی می‌کند، ناقل مطلوبی برای الحاق‌های DNA به طول حدود ۱۵ kb می‌باشد. فاژ λ به‌طور انتخابی در باکتری‌ها ایجاد عفونت کرده و طی یک مسیر لیتیک یا غیرلیتیک (لیزوژنیک) همانندسازی می‌کند. فاژ λ حاوی یک دم تک-رشته ۱۲ بازی خود- مکمل (انتهای چسبنده[1]) در هر دو انتهای DNA دو-رشته ۵۰ kb می‌باشد. با ایجاد عفونت در باکتری‌ها، دو انتهای چسبنده (جایگاه cos) یک DNA تک فاژ λ با خودش سرد شده و دو انتها به طریق کووالان توسط DNA لیگاز سلول میزبان به یکدیگر اتصال می‌یابند. این DNA حلقوی به عنوان الگویی برای رونویسی و همانندسازی عمل می‌کند. از فاژ λ، همراه با قطعات حاصل از تجزیه کل DNA ژنومی سلول میزبان توسط آندونوکلئاز محدودکننده که در داخل آن قرار داده شده‌اند، برای ایجاد عفونت در باکتری‌ها استفاده می‌شود. باکتریوفاژ نوترکیب که از سلول‌های لیزشده آزاد می‌شوند، جمع‌آوری شده و یک کتابخانه ژنومی در فاژ λ را می‌سازند. به دلیل افزایش اندازه الحاق‌های DNA، این کتابخانه فاژی را می‌توان سریع‌تر از یک کتابخانه پلاسمیدی غربال نمود.

ناقلین متعدد فاژ λ برای راهکارهای کلون‌سازی مختلف ساخته شده‌اند. تنها یک ناقل فاژ λ ژنریک شرح داده می‌شود. یک قطعه ۱۵ تا ۲۵ kb از DNA فاژ را می‌توان بدون ایجاد اختلال در همانندسازی آن در *E.coli*، جایگزین نمود (شکل ۱۹-۷). طول DNA فاژی که قرار است در داخل ذره ویروس بسته‌بندی شود، می‌بایست حدود ۵۰ kb باشد. DNA خطی فاژ λ توسط یک آندونوکلئاز محدودکننده اختصاصی هضم می‌شود که نتیجه آن تولید قطعات انتهایی کوچک حاوی جایگاه‌های cos (بازوها) می‌باشد. سپس اینها از

1. Cohesive

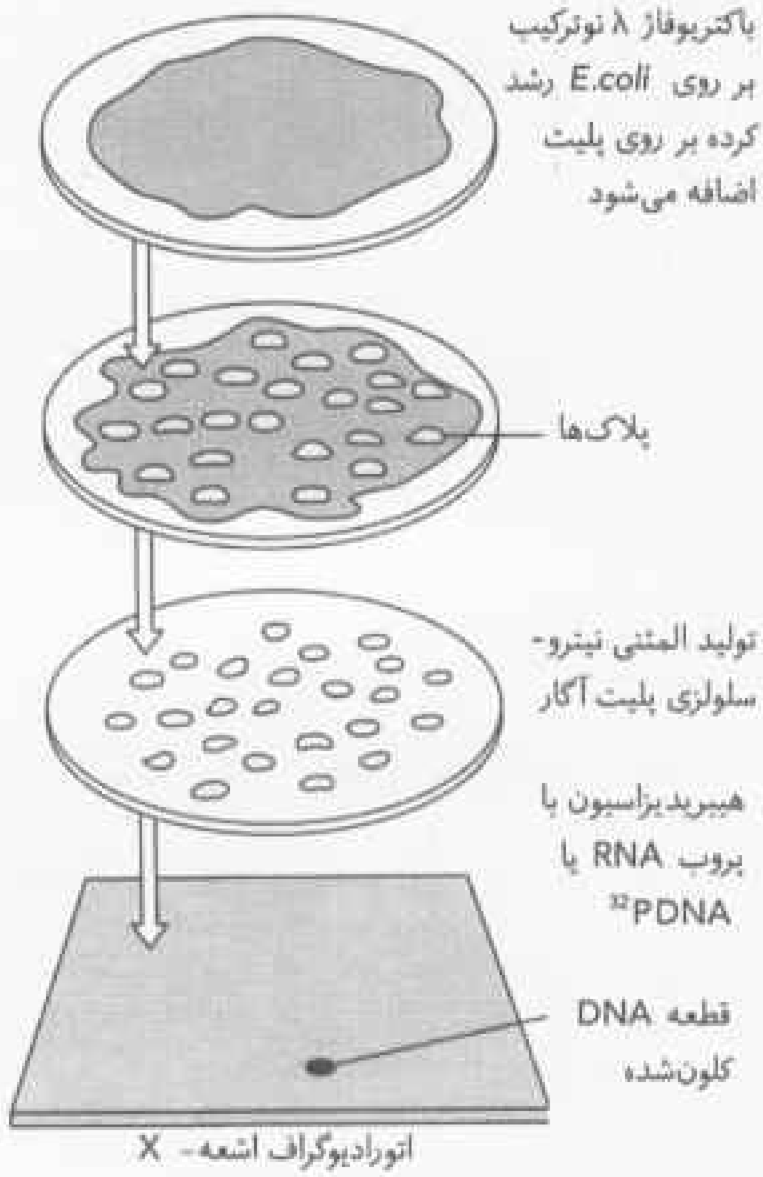


شکل ۱۹-۷ کلون‌سازی DNA ژنومی در باکتریوفاژ λ. با استفاده از یک آندونوکلئاز محدودکننده (برای مثال، EcoRI)، کل DNA ژنومی به‌طور ناقص هضم می‌شود. نتیجه تولید قطعات DNA با اندازه‌های مختلف و دو انتهای تک-رشته چسبنده می‌باشد. قطعاتی از DNAای به‌نام بازوهای Cos با همان آندونوکلئاز محدودکننده از DNA باکتریوفاژ تولید می‌شود. بازوهای Cos خالص‌شده حامل پیام‌های توالی موردنیاز برای بسته‌بندی DNA در داخل یک ویریون باکتریوفاژی است. قطعات ژنومی با بازوهای Cos مخلوط، سرد و دوخته می‌شوند تا آرایه‌هایی از DNA خطی به‌هم پیوسته تولید شود. بسته‌بندی در آزمایشگاه با پروتئین‌های باکتریوفاژ λ تنها با قطعاتی از DNA ژنوی رخ می‌دهد که در بین بازوهای Cos طول‌های مجاز (۲۵-۱۵ kb) را داشته باشند.

قطعات میانی بزرگ‌تر جدا می‌شوند. DNA ژنومی سلول به‌طور نسبی توسط آنزیم‌های آندونوکلئاز محدودکننده مناسب هضم می‌شوند تا امکان هیبریدشدن و اتصال آنها به بازوهای فاژ فراهم گردد. قطعات کوچکتر یا بزرگتر از kb ۲۵-۱۵ با بازوهای cos هیبرید می‌شوند، ولی در داخل ذرات باکتریوفاژ بسته‌بندی نمی‌گردند. تمامی اطلاعات مورد نیاز فاژ برای ایجاد عفونت و همانندسازی در باکتری‌ها، در داخل بازوهای cos حمل می‌شوند. DNA فاژی نوترکیب با پروتئین‌های فاژ λ در آزمایشگاه مخلوط شده که به‌صورت ویریون‌های عفونی همایش می‌یابند. در ادامه این ذرات در یک سوش مناسب *E.coli* ازدیاد می‌یابند تا یک کتابخانه فاژ λ تولید شود. بسیاری از سوش‌های *E.coli* به‌طریق ژنتیکی تغییر داده شده‌اند تا از همانندسازی ویریون‌های نوترکیب اختصاصی حمایت کنند.

غربالگری کتابخانه‌های باکتریوفاژ

یک کتابخانه باکتریوفاژ را می‌توان با گستردن ویروس بر روی یک لایه پیوسته از باکتری‌های (یک چمن باکتریایی) رشدکرده بر روی پلیت‌های آگاری غربال نمود (شکل ۲۰-۷). هر



شکل ۲۰-۷ غربالگری کتابخانه‌های ژنومی در باکتریوفاژ λ. E.coli صلاحیت‌دار به‌طور انبوه بر روی پلیت آگار رشد نموده و سپس با باکتریوفاژ نوترکیب پوشانده می‌شود. در محل‌هایی که باکتری‌ها توسط فاژ λ عفونی و سپس لیز شده‌اند، پلاک‌هایی به‌وجود می‌آید. از طریق تماس پلیت با صافی نیتروسلولزی می‌توان المثنی‌هایی را تولید نمود. DNA با استفاده از NaOH دناتوره و به نیتروسلولز اتصال داده می‌شود. DNA ثابت‌شده با یک پروب نشاندار با ^{32}P هیبرید و در معرض فیلم اشعه-X قرار داده می‌شود. اتو-رادیوگراف پلاک(های) دارای DNA نوترکیب موردنظر را نشان می‌دهد.

فاژ یک سلول را عفونی نموده، در آن همانندسازی کرده و آن را لیز می‌کند. سپس ویریون‌های حاصل باکتری‌های موجود در مجاورت محل اولین سلولی که عفونی‌شده را عفونی و سپس لیز می‌کنند تا یک ناحیه شفاف یا یک پلاک در چمن باکتریایی مات به‌وجود آید. فاژ، موجود در داخل هر پلاک، جذب یک صافی نیتروسلولزی (همانند گستره المثنی) شده و DNA با NaOH بر روی صافی ثابت می‌شود. موقعیت قطعات DNA کلون‌شده مورد نظر با ایجاد هیبرید بین یک پروب DNA یا RNA نشاندار و DNA متصل به صافی و به‌دنبال آن اتورادیوگرافی تعیین می‌شود. باکتریوفاژ موجود در پلاک مربوط به هیبرید نشاندار متصل به صافی، برداشت شده و برای آنالیز بعدی در باکتری‌ها تکثیر داده می‌شود. در صورتی که توالی کامل یا نسبی cDNA مورد نظر شناخته‌شده باشد، می‌توان از PCR نیز استفاده نمود. در اینجا قسمت‌هایی از چندین پلاک برداشت شده و در صورتی که DNA مورد نظر در یک یا چند مورد وجود داشته باشد، یک ناحیه را می‌توان با یک جفت پرایمر مناسب به‌طریق PCR تکثیر داد. سپس محصول PCR به‌طریق الکتروفورز بر روی ژل مورد جستجو قرار می‌گیرد. کتابخانه‌های DNA مکمل موجود در باکتریوفاژ نیز ساخته می‌شوند که حاوی بازوهای cos فاژ می‌باشند. در صورتی‌که cDNA با DNA فاژ نوترکیب شود تا امکان بیان ژن فراهم گردد، مثلاً λgt11، پلاک‌ها را می‌توان به‌طریق ایمونولوژیکی با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد آنتی‌ژن موردنظر غربال نمود.

کلون‌سازی قطعات DNA در داخل کاسمید و ناقلین کروموزومی مصنوعی

گر چه فاژ λ معمول‌ترین ناقل مورد استفاده برای ساختن کتابخانه‌های DNA ژنومی است، طول بسیاری ژن‌ها از اندازه حداکثر DNAای که می‌تواند بین دو بازوی فاژ قرار داده شود، بیشتر می‌باشد. یک ناقل کاسمیدی می‌تواند الحاق‌های DNA خارجی به حدود ۴۵ kb را جای دهد. برای کلون‌سازی قطعات DNA به ترتیب ۲۰۰-۱۰۰ kb و ۵۰۰-۲۰۰ kb، **کروموزوم‌های ساختگی باکتریایی** [1] **(BACs) و کروموزوم‌های ساختگی مخمری** [2] **(YACs)** ابداع شده‌اند. با وجود اینکه کار با ناقلین کاسمیدی و YAC مشکل است، کتابخانه‌های آنها امکان کلون‌سازی ژن‌های بزرگ همراه با توالی‌های تنظیمی طرفی آنها و همچنین خانواده‌هایی از ژن‌ها یا ژن‌های مجاور را فراهم می‌سازند.

ناقلین کاسمیدی ترکیبی از ناقلین پلاسمیدی و باکتریوفاژی هستند. کاسمیدها حاوی یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک برای انتخاب ملکول‌های DNA نوترکیب، یک مبداء همانند-سازی برای تکثیر در باکتری‌ها و یک جایگاه cos برای بسته‌بندی ملکول‌های نوترکیب در ذرات باکتریوفاژ می‌باشند. باکتریوفاژ حاوی DNA کاسمیدی نوترکیب می‌تواند در E.coli ایجاد عفونت کرده و DNA را به داخل سلول تزریق کند. ناقلین کاسمیدی حاوی تنها

1. Bacterial artificial chromosomes
2. Yeast artificial chromosomes

حدود ۵ kb از DNA باکتریوفاژی ۵۰ kb هستند و بنابراین نمی‌توانند همانندسازی و همایش ذرات فاژی عفونی جدید را هدایت کنند. در عوض، DNA کاسمیدی نوترکیب حلقوی شده و به‌صورت یک پلاسمید بزرگ همانندسازی می‌کند. کلونی‌های باکتریایی دارای نوترکیب‌های مورد نظر انتخاب شده و با روش‌هایی مشابه انواع شرح‌داده‌شده برای پلاسمیدها تکثیر داده می‌شوند.

برای ساختن YACs از روش‌های اجرایی استاندارد کلون‌سازی و برخی روش‌های متداول استفاده می‌شود. قطعات DNA خارجی بسیار بزرگ به توالی‌های DNA مخمر اتصال داده می‌شوند که قسمتی از آنها به‌عنوان تلومر (دو انتهای بازوهای کروموزومی) و دیگری به‌صورت سانترومر و یک مبداء همانندسازی عمل می‌کند. YAC DNA نوترکیب با ترانسفورماسیون به داخل مخمر ارائه می‌گردد. ساخته‌های YAC طوری طراحی می‌شوند که مخمر ترانسفورمه‌شده با کروموزوم‌های نوترکیب، به صورت کلونی‌هایی رشد کنند که به طریق چشمی قابل تمایز باشند. این موضوع سبب تسهیل در انتخاب و آنالیز قطعات DNA کلون‌شده می‌شود. **حیوانات ترانس‌ژنیک** را نیز می‌توان با ارائه YAC DNA نوترکیب به داخل ژنوم آنها تولید نمود. در صورتی که این حیوانات یک ژن معیوب انسانی را بیان کنند، از آنها می‌توان به‌عنوان مدلی برای مطالعه بیماری انسانی مربوطه استفاده نمود (ارتباط بالینی ۸-۷).

ارتباط بالینی ۸-۷

استفاده از موش‌های خانگی ترانس‌ژنیک کروموزوم مصنوعی مخمر (YAC) برای مطالعه بیماری هانتینگتون

اغلب مطالعه نقش یک پروتئین جهش‌یافته در ایجاد یک بیماری در ناهنجاری‌های انسانی مشکل است. ابداع مدل‌های حیوانی یک ابزار باارزش در مطالعه بیماری‌های انسانی نظیر ناهنجاری نورودژنراتیو با شروع در بالغین، بیماری هانتینگتون[1] (HD) (OMIM۱۴۳۱۰۰) می‌باشد. HD با توسعه تری‌نوکلئوتید CAG در اگزون ۱ ژن HD به‌وجود می‌آید که منجر به تولید قطعات پلی‌گلوتامینی در پروتئین هانتینگتون (htt) می‌شود. به‌نظر می‌رسد قطعات پلی‌گلوتامینی حاصل برای نواحی انتخابی مغز سمی باشند. یک مدل ترانس‌ژنیک موش خانگی با یک ترانس‌ژن YAC تولید شد که ژن HD انسانی با طول کامل را همراه با توالی‌های فرادست ۲۵ kb و فرودست ۱۲۰ kb جهت تضمین قرارگیری نواحی تنظیمی داخلی داشت. موش‌های YAC حاوی ۴۶، ۷۲، و ۱۲۸ تکرار CAG خلق شدند. مدل ترانس‌ژنیک YAC 128 بسیار شبیه بیماری انسانی بود. این موش‌ها دچار نقص‌های حرکتی و شناختی مشابه نقص‌های موجود در انسان شدند. نوع وحشی پروتئین htt اساساً در داخل سیتوپلاسم یافت می‌شود، در حالی که پروتئین جهش‌یافته در هسته قرار می‌گیرد. ارزیابی آنتی‌بادی ضد htt بافت‌های مغز از موش‌های خانگی نوع وحشی (WT) و موش‌های Y128 در یک و دو ماهگی نشان داد که پروتئین‌های htt طبیعی و جهش‌یافته در هسته‌های موش‌های WT یا موش‌های Y128 یک ماهه وجود ندارند؛ پروتئین htt جهش‌یافته در هسته فقط در جسم مخطط موش‌های Y128 دو ماهه یافت شد، و همانند موش Y128 با سن بیشتر، با وجود اینکه مقداری htt جهش‌یافته در هسته‌های موجود در نواحی دیگر مغز یافت شد، افزایش یافت و با بیشترین میزان در جسم مخطط باقی ماند. جسم مخطط ناحیه غالبی است که هم در انسان مبتلا به HD و هم در موش Y128 دوماهه تحت تأثیر قرار می‌گیرد، و وقتی نقص‌های حرکتی و شناختی برای اولین بار در این موش‌ها مشاهده شد، تجمع htt با سن نیز ارتباط داشت. به‌نظر می‌رسد که شروع قرارگیری در هسته پروتئین جهش‌یافته htt در جسم مخطط نقش اصلی را در تخریب انتخابی مشاهده شده در HD دارد. مکانیسم نحوه ایجاد اثرات سمی در هنگام قرارگیری پروتئین جهش‌یافته htt در هسته ناشناخته است، ولی معتقدند مستلزم تغییر بیان ژن و احتمالاً فعال‌سازی آپوپتوز است.

1. Huntington disease

کلون‌سازی مجدد امکان تعریف قطعات بزرگ DNA را فراهم می‌سازد

آنالیز کامل عناصر وظیفه‌دار در یک قطعه DNA نیاز به تعیین توالی کل ملکول دارد. تکنیک‌های رایج می‌توانند ۴۰۰-۲۰۰ باز را تعیین توالی کنند، در حالی‌که الحاق‌های DNA کلون‌شده اغلب بسیار بزرگتر هستند. نقشه‌های محدودکننده کلون DNA ابتدایی برای شکستن DNA به قطعات کوچکتر برای **ساب‌کلون‌سازی**[1] **(کلون‌سازی مجدد)** جهت آنالیز بعدی ضروری هستند. توالی هر قطعه DNA که دوباره کلون شده است را می‌توان تعیین نمود. نواحی همپوشان DNA ساب‌کلون‌شده به شکل مناسبی ترتیب آنها را تعیین نموده و توالی کامل کلون DNA ابتدایی را مورد تأیید قرار می‌دهد.

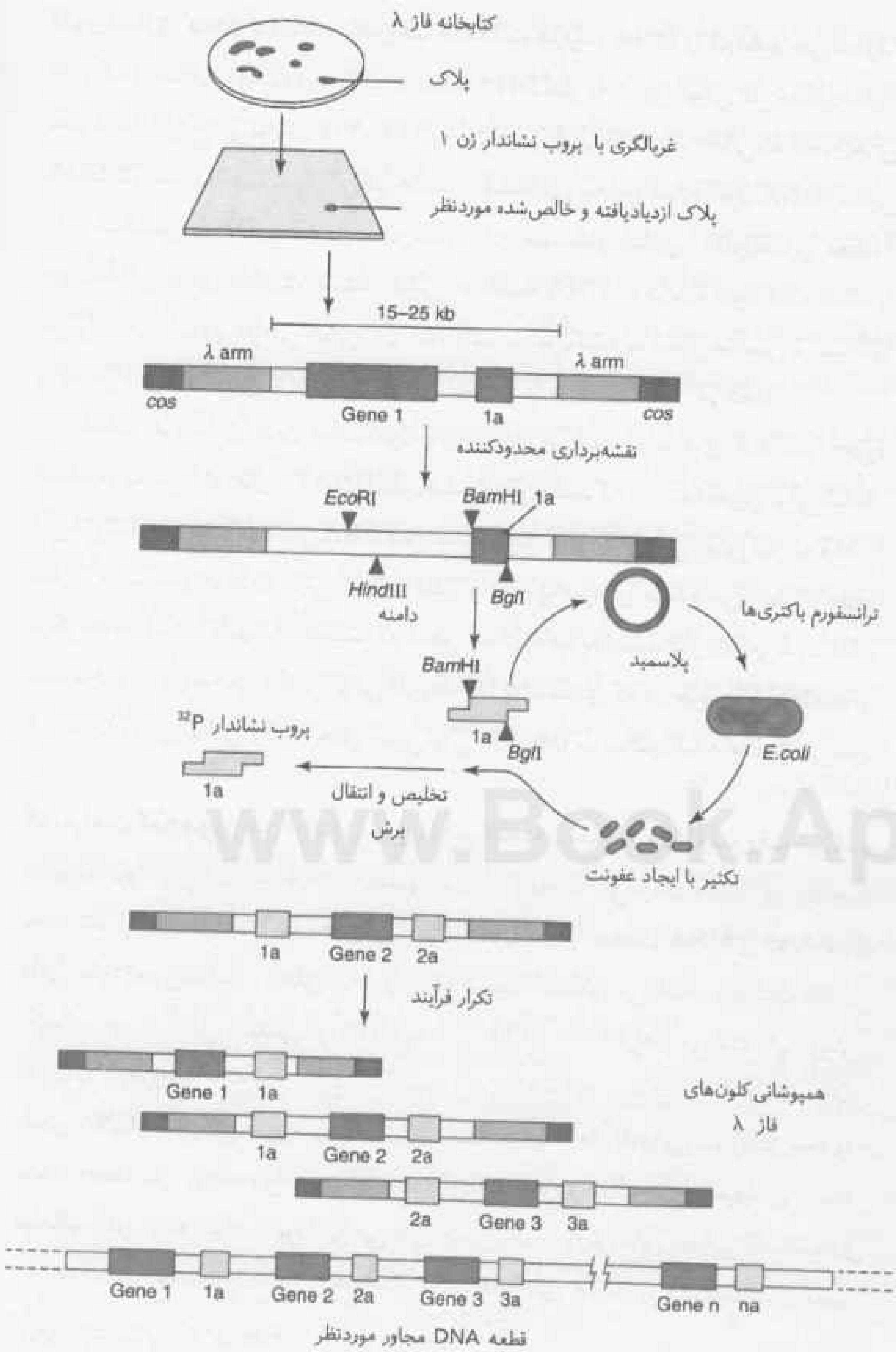
اغلب غربالگری بدون ساب‌کلون‌سازی انجام می‌شود. پرایمرهای ضدمعنی[2] مورد استفاده، مکمل انتهاهای ′3 DNA کلون‌شده‌ای می‌باشند که در ابتدا تعیین توالی شدند. این فرایند تکرار شده تا تمامی DNA کلون‌شده تعیین توالی گردد. این روش نیاز به فراهم-سازی ساب‌کلون‌ها ندارد، ولی نیازمند آنالیز و تهیه پرایمرهای متعدد می‌باشد. از طرف دیگر، DNA ساب‌کلون‌شده همیشه در داخل همان ناحیه پلاسمید قرار داده می‌شود، لذا از یک مجموعه پرایمرهای مکمل توالی‌های DNA پلاسمیدی که در طرفین DNA الحاقی قرار دارند، برای تمامی واکنش‌های تعیین‌توالی با DNA ساب‌کلون‌شده استفاده می‌شود.

قدم‌زدن کروموزومی آرایش ژنی را در قطعات بلند DNA تعریف می‌کند

دانش نحوه آرایش ژن‌ها و عناصر تنظیمی آنها در کروموزوم می‌بایست منجر به شناخت نحوه تنظیم هماهنگ مجموعه‌های ژنی گردد. کلون‌سازی قطعات DNAای که به اندازه کافی برای تعیین‌هویت ژن‌های مجاور بزرگ هستند، مشکل می‌باشد. با ترکیب چندین تکنیک، امکان آنالیز قطعاتی از DNA به طول kb ۱۰۰-۵۰ فراهم می‌گردد. این روش، **قدم‌زدن کروموزومی**[3]، به این دلیل امکانپذیر است که کتابخانه‌های فاژ λ یا کاسمیدی حاوی DNA ژنومی که به‌طور نسبی شکسته شده است، در جایگاه‌های آندونوکلئاز محدود-کننده اختصاصی بریده می‌شوند. قطعات کلون‌شده حاوی توالی‌های همپوشان با سایر قطعات کلون‌شده خواهند بود. نواحی‌های همپوشان با روش‌های اجرایی نقشه‌برداری محدودکننده، ساب‌کلون‌سازی، غربالگری کتابخانه‌های فاژ λ یا کاسمیدی، و تعیین توالی، تعیین‌هویت می‌شوند.

روش اجرایی قدم‌زدن کروموزومی در شکل ۲۱-۷ نشان داده شده است. یک کتابخانه فاژ λ با یک پروب DNA یا RNA از نظر توالی مورد نظر غربال می‌شود. DNA انتخاب شده کلون‌شده و نقشه‌برداری محدودکننده می‌شود، سپس یک قطعه کوچک در یک پلاسمید ساب‌کلون شده، تکثیر یافته، تخلیص شده و به‌طریق انتقال بریدگی نشاندار می‌شود. از این پروب نشاندار برای غربال مجدد کتابخانه فاژ λ از نظر توالی‌های مکمل

1. Subcloning 2. Antisense 3. Chromosome walking



شکل ۲۱-۷ قدم‌زدن کروموزومی برای آنالیز قطعات DNA مجاور در یک ژنوم. در ابتدا یک قطعه DNA به طریق انتقال بریدگی برای غربال یک کتابخانه از نظر فاژ λ نوترکیب حامل ژن موردنظر، نشاندار می‌شود. DNA ازدیادیافته توسط چندین آندونوکلئاز محدودکننده نقشه‌برداری شده تا یک ناحیه جدید (1a) در داخل DNA کلون‌شده ابتدایی انتخاب شود که می‌تواند دوباره کلون گردد. DNA دوباره کلون‌شده (1a) برای شناسایی سایر قطعات DNA در داخل کتابخانه ابتدایی به‌کار می‌رود که با ناحیه DNA ازدیادیافته ابتدایی همپوشان می‌باشند. این فرایند را می‌توان به دفعات زیادی تکرار نمود تا نواحی DNA مجاور فرادست و فرودست DNA ابتدایی (ژن ۱) موردنظر شناسایی گردد.

استفاده شده و اینها بعداً کلون می‌شوند. سپس DNA کلون‌شده همپوشان تازه تعیین هویت‌شده به همان طریق کلون DNA ابتدایی برای جستجوی توالی‌های همپوشان دیگر مورد بررسی قرار می‌گیرد. در ژنوم‌های اوکاریوتی بزرگتر می‌بایست دقت داشت تا پروب DNA ساب‌کلون‌شده حاوی موردی از تعداد زیاد توالی‌های DNA تکراری نباشد. در صورتی که یک پروب DNA ساب‌کلون‌شده حاوی یک توالی تکراری باشد، با پلاک‌های

ارتباط بالینی ۹-۷

استفاده از قدم‌زدن و پرش کروموزومی برای تعیین‌هویت ژن فیبروز کیستیک

فیبروزکیستیک[1] (CF) (OMIM ۶۰۲۴۲۱) یک ناهنجاری اتوزومال مغلوب شدید شایع (۱ در ۲۰۰۰ تولد) حاصل از جهش‌هایی در تنظیم‌کننده هدایت عرض غشایی فیبروز کیستیک[2] (CFTR) است. این جهش‌ها منجر به انتقال معیوب در غدد ریوی و اگزوکرین می‌شود. علائم بالینی اولیه همراه با CF، شامل بیماری ریوی مزمن است. تعیین لوکوس CF از طریق آنالیز پیوستگی مارکرهای چندشکلی متعدد DNA در بازوی بلند کروموزوم ۷، باند q31، صورت گرفت. تقریباً یک ناحیه ۵۰۰ kb از کروموزوم ۷ با قدم‌زدن و پرش کروموزومی[3] برای شناسایی ژن CF مورد آنالیز قرار گرفت. پرش کروموزومی به محققین این امکان را می‌دهد تا از نقطه انتهایی هر پرش، یک گام دوجهته جدید را آغاز کنند. از کلون‌های فاژی و کاسمیدی مشتق از قدم‌زدن و پرش کروموزومی یک نقشه محدودکننده ساخته شد که نهایتاً منجر به شناسایی ژن CF (ژن CFTR) با طول حدود ۲۵۰ bp گردید. شناسایی ژن CFTR و جهش اصلی آن، امکان تشخیص قبل‌تولد و بالینی این بیماری را فراهم ساخته است. در سال‌های بعد از شناسایی ژن CFTR، مطالعات زیادی در جهت اصلاح این بیماری و جنبه‌های مرتبط با فناوری مورد نیاز برای تحویل ژن‌ها به سلول‌های هدف صورت گرفته است. هر چند، موفقیت حاصل گول‌زننده بوده است. اخیراً گزارش شده است که یک ناقل BAC با یک الحاق ۲۵۰٫۳ kb حاوی ژن CFTR کامل ژنومی همراه با جایگاه‌های تنظیمی فرادست و فرودست ساخته شده است. ژن CFTR انسانی در یک رده سلول موش خانگی کشت‌شده از نسخه‌های قرارگرفته در ناقل BAC به درستی بیان شد. این نتایج اشاره به کاربرد بالقوه ژن درمانی CF دارند.

1. Cystic fibrosis
2. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
3. Chromosome walking and jumping

باکتریوفاژی متعددی هیبرید خواهد شد و مانع تعیین‌هویت یک کلون همپوشان اختصاصی می‌شود. از این روش‌های اجرایی همراه با پرش کروموزومی[1] برای تعیین‌هویت ژن فیبروز کیستیک انسان استفاده شده است (ارتباط بالینی ۹-۷).

۸-۷ • ناقلین بیانی و پروتئین‌های ادغامی

روش‌هایی که تا اینجا در خصوص DNA نوترکیب شرح داده شده‌اند، اساساً مرتبط با غربالگری، ازدیاد، و تخلیص DNA کلون‌شده می‌باشند. یکی از اهداف مهم مطالعات DNA نوترکیب، بیان یک ژن خارجی در باکتری‌ها همراه با تولید محصولی به شکل دارای فعالیت بیولوژیکی می‌باشد. تعیین‌توالی بسیاری از ژن‌های باکتریایی و نواحی پهلویی آنها سبب شناسایی آرایش فضایی توالی‌های تنظیمی مورد نیاز برای بیان ژن‌ها شده است. برای رونویسی یک ژن نیاز به یک پروموتر و عناصر تنظیمی دیگر ژن می‌باشد (ص ۴۱۵). هر چند، رونوشت mRNA یک ژن اوکاریوتی نوترکیب در یک سیستم باکتریایی ترجمه نمی‌شود، زیرا فاقد توالی شناسایی باکتریایی، یا توالی شاین-دالگارنو، مورد نیاز برای اتصال مناسب یک ریبوزوم باکتریایی وظیفه‌دار می‌باشد. **ناقلین بیانی**[2] رونویسی وظیفه‌دار الحاق‌های DNA را تسهیل می‌کنند. یک ژن خارجی را می‌توان در داخل چنین ناقلی در فرودست یک پروموتر تنظیمی، ولی در داخل یک ژن باکتریایی، معمولاً ژن lacZ، قرار داد. رونوشت mRNA این DNA نوترکیب حاوی توالی شاین-دالگارنو lacZ، کدون‌های مربوط به انتهای ′5

1. Chromosome jumping 2. Expression vectors

پروتئین lacZ و به دنبال آن کدون‌های مربوط به ژن خارجی کامل مورد نظر می‌باشد. محصول پروتئینی یک **پروتئین ادغامی**[1] حاوی اسیدهای آمینه انتهای آمینو پروتئین lacZ و توالی کامل محصول پروتئین خارجی است.

بیان ژن‌های خارجی در باکتری‌ها امکان سنتز پروتئین‌های کدشده توسط آنها را فراهم می‌سازد

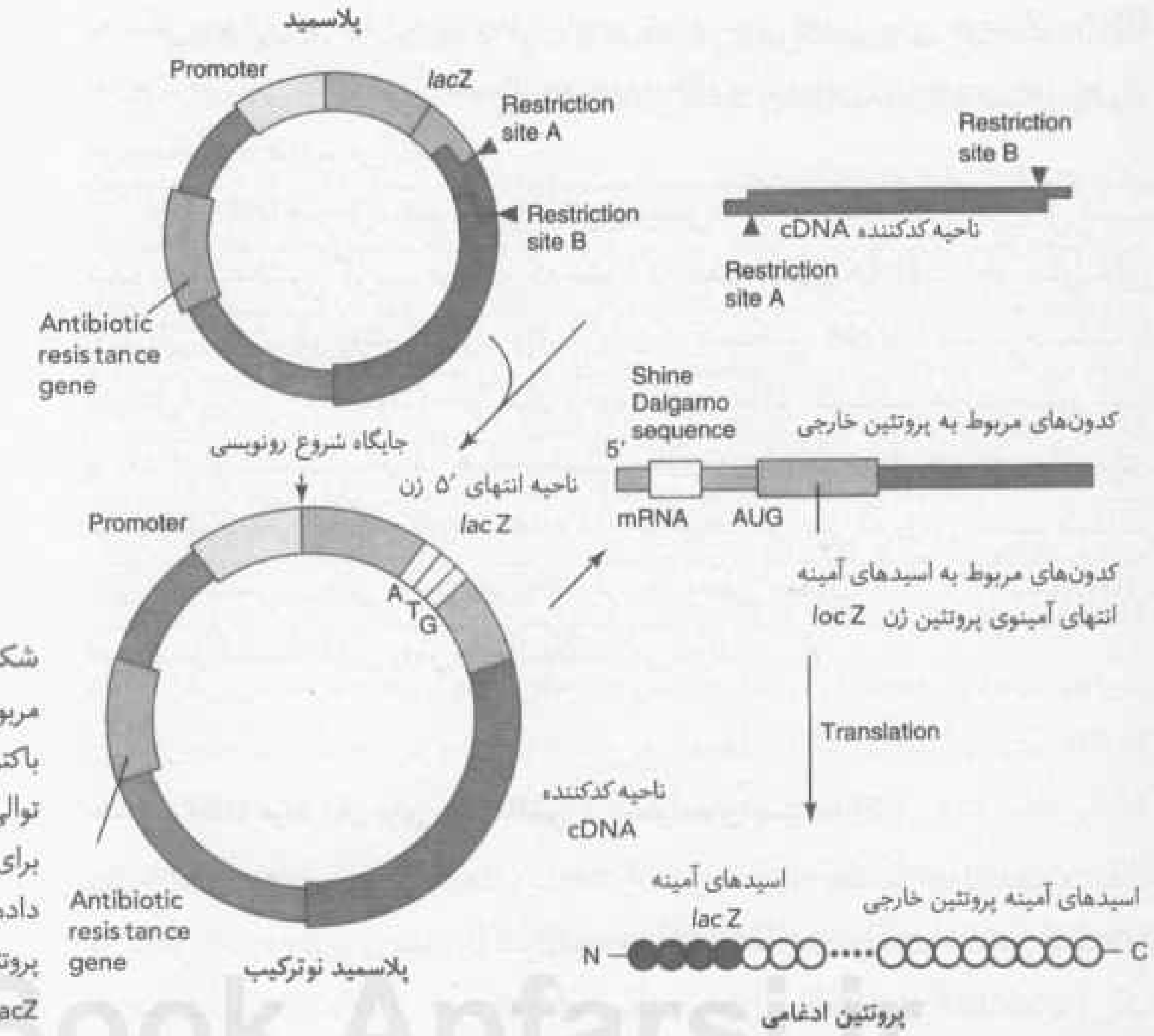
بسیاری از ناقلین پلاسمیدی و باکتریوفاژی امکان بیان ژن‌های اوکاریوتی در سلول‌های باکتریایی را فراهم می‌سازند. باکتری‌هایی که همانندسازی سریعی دارند، به یک کارخانه بیولوژیکی برای تولید مقادیر زیاد پروتئین‌های اختصاصی تبدیل می‌شوند که ارزش تحقیقاتی، بالینی و تجارتی دارند. به عنوان مثال، با استفاده از فناوری‌های نوترکیب تولید هورمون‌های پروتئینی برای درمان مبتلایان به اختلال در تولید هورمون صورت گرفته است. شکل ۲۲-۷ یک ناقل پلاسمیدی عمومی برای بیان یک ژن پستانداران را نشان می‌دهد. بیاد دارید که ژن الحاقی می‌بایست به شکل cDNA از mRNA مربوطه تولید شده باشد، زیرا سیستم باکتریایی قادر به برداشت اینترون‌های موجود در رونوشت pre-mRNA نیست. این DNA می‌بایست مطابق با کدون‌های ناحیه انتهای ′۳ پروتئین باکتریایی، در هنگام خلق یک پروتئین ادغامی، قرار داده شود. به عبارت دیگر، الحاق می‌بایست بعد از یک کدون سه‌حرفی پروتئین باکتریایی و در محل شروع یکی از کدون‌های سه‌حرفی پروتئین اوکاریوتی انجام شود تا ترجمه مناسب تضمین گردد. بالاخره، برای تولید یک رونوشت وظیفه‌دار، ژن خارجی می‌بایست در موقعیت مناسب نسبت به پروموتر قرار داده شود. این عمل با کلون‌سازی جهت‌دار انجام می‌شود.

پروتئین‌های اوکاریوتی که در باکتری‌ها سنتز می‌شوند، اغلب ناپایدار بوده و توسط پروتئازهای سلولی تجزیه می‌شوند. هر چند، محصولات پروتئین ادغامی معمولاً پایدار می‌باشند. اسیدهای آمینه‌ای که توسط ژنوم پروکاریوتی کد می‌شوند، ممکن است به طریق آنزیمی یا شیمیایی از پروتئین ادغامی تخلیص شده جدا گردند. یکی از راهکارها برای غلبه بر ناپایداری داخل سلولی برخی پروتئین‌ها، تولید پروتئین ادغامی است که ترشح می‌شود. برای این کار لازم است ژن خارجی طوری در یک ناقل کلون شود که پروتئین ادغامی سنتز شده حاوی پپتید پیامی باشد که توسط پپتیداز پیام باکتریایی شناسایی شود که به شکل مناسبی این پروتئین را برای ترشح پردازش می‌کند.

ناقلین بیانی در سلول‌های اوکاریوتی

بیماری‌های ژنتیکی در انسان حاصل از دست رفتن تولید پروتئین‌های داخل سلولی یا تولید اشکال معیوب آنها می‌باشند. برای استفاده از تکنیک‌های نوآوری برای درمان این

1. Fusion protein



شکل ۲۲-۷ ساختن یک ناقل بیانی باکتریایی. cDNA مربوط به پروتئین موردنظر در فرودست توالی‌های تنظیمی باکتریایی (پروموتر [P]) مربوط به ژن lacZ، توالی کدکننده توالی شاین-دالگارنو mRNA، کدون AUG، و چند کدون برای اسیدهای آمینه انتهای آمینوی پروتئین lacZ، قرار داده می‌شود. mRNA حاصل از این ناقل بیانی سنتز یک پروتئین ادغامی با چند ریشه انتهای آمینو یکسان با پروتئین lacZ را هدایت می‌کند.

بیماری‌ها، ناقلین می‌بایست در داخل سلول‌های پستانداران قرار داده شوند. همچنین لازم است این ناقلین مکانیسم هدفمندسازی داشته باشند که ناقلین برای بافت یا سلول‌های متأثرشده حاوی پروتئین مختل، انتخابی باشند. ناقلین متعددی امکان بیان ژن‌های DNA خارجی در سلول‌های پستانداران موجود در کشت بافت را فراهم می‌سازند. این ناقلین به‌طور وسیعی برای تشریح پردازش بعد از ترجمه و سنتز پروتئین‌ها در سلول‌های اوکاریوتی کشت شده مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدفمندسازی ژن‌های خارجی به بافت‌های اختصاصی یا در مراحل نموی اختصاصی با موفقیت بسیار محدودی همراه بوده است.

ناقلین بیانی ابداع شده‌اند که امکان همانندسازی، رونویسی و ترجمه ژن‌های خارجی در سلول‌های اوکاریوتی کشت‌شده را فراهم می‌سازند. اینها شامل هر دو نوع ناقل RNA و DNA ویروسی هستند. ناقلین شاتل[1] حاوی هر دو نوع پیام همانندسازی باکتریایی و اوکاریوتی هستند و به همین دلیل امکان همانندسازی ناقل را در باکتری‌های و سلول‌های پستانداران فراهم می‌سازند. ناقلین شاتل این امکان را فراهم می‌سازند که ژن در یک سیستم باکتریایی به مقادیر زیاد کلون‌سازی و تخلیص شده و سپس برای بیان به سلول‌های پستانداران منتقل گردد. برخی ناقلین بیانی در داخل ژنوم سلول میزبان قرار داده می‌شوند و

1. Shuttle vectors

به شکل پایداری در سلول‌های دختر بیان می‌شوند. سایر ناقلین بیانی به‌صورت DNA خارج کروموزومی یا اپی‌زومی باقیمانده و تنها امکان بیان موقتی ژن خارجی خود قبل از مرگ سلولی را فراهم می‌کنند.

ارائه DNA خارجی، نظیر ناقلین بیانی ویروسی، به‌داخل سلول‌های اوکاریوتی کشت شده را **ترانسفکشن**[1] گویند، فرایندی که مشابه ترانسفورماسیون DNA به‌داخل سلول‌های باکتریایی است. دو روش متداول برای تولید یک کمپلکس DNA با کلسیم فسفات یا دی‌اتیل آمینواتیل[2] (DEAE)-دکستران وجود دارد؛ بعداً این کمپلکس‌ها آندوسیتوز شده و بعد از ترانسفکت‌شدن در هسته، همانندسازی و بیان می‌شوند. هر دو روش برای تولید ناقلین بیانی زودگذر مورد استفاده قرار می‌گیرند، در حالی‌که روش کلسیم فسفات برای بیان دائمی ژن‌های خارجی نیز به‌کار می‌رود. به‌طور معمول، ۱۰٪ تا ۲۰٪ سلول‌های موجود در کشت، با این روش‌ها ترانسفکت می‌شوند.

عناصر DNA مورد نیاز برای بیان ناقلین در سلول‌های پستانداران

بیان ژن‌های نوترکیب در سلول‌های پستانداران نیاز به وجود عناصر کنترل‌کننده مناسب در داخل ناقل دارد. برای بیان، ژن کلون‌شده در داخل ناقل در موقعیت مناسبی نسبت به عناصر کنترلی قرار داده می‌شود که شامل یک پروموتر، پیام‌های پلی‌آدنیلاسیون و یک فزاینده می‌باشند. احتمال دارد بیان با قرارگیری یک اینترون بهتر شود. در صورت استفاده از کل DNA ژنومی برای کلون‌سازی، برخی یا تمامی این عناصر DNA ممکن است در ژن نوترکیب وجود داشته باشند. هرچند قطعه کلون‌شده مشخصی که به طریق شکست آندونوکلئاز محدودکننده تولید شده است، ممکن است فاقد این عناصر باشد. یک cDNA این عناصر DNA مورد نیاز را نخواهد داشت. لذا در صورتی‌که لازم است این ناقل بیانی در سلول‌های پستانداران مورد استفاده قرار گیرد، باید طوری ساخته شود که تمامی عناصر کنترلی مورد نیاز را داشته باشد.

عناصر کنترلی را می‌توان با فناوری‌های نوترکیب در داخل ناقل قرار داد. برای بیشترین کاربری ناقل، عناصر فزاینده و پروموتر می‌بایست توسط طیف وسیعی از سلول‌های موجود در کشت مورد شناسایی قرار گیرند. عناصر کنترلی حاصل از ویروس‌هایی با یک دامنه وسیع میزبان، نظیر **پاروویروس**، **ویروس میمونی ۴۰ (SV40)**، **ویروس سارکوم راس**، و **سیتو-مگالوویروس انسانی**، به‌کار می‌روند. این ناقل می‌بایست حاوی یک مبداء ویروسی از توالی (ori) همانندسازی باشد. فاکتورهای پروتئینی اختصاصی که توسط ژن‌های الحاقی در ناقل کد می‌شوند و یا قبلاً به داخل ژنوم میزبان ارائه شده‌اند، این توالی ori را برای شروع همانندسازی DNA شناسایی نموده و با آن تعامل می‌کنند.

---

1. Transfection   2. Diethylaminoethyl

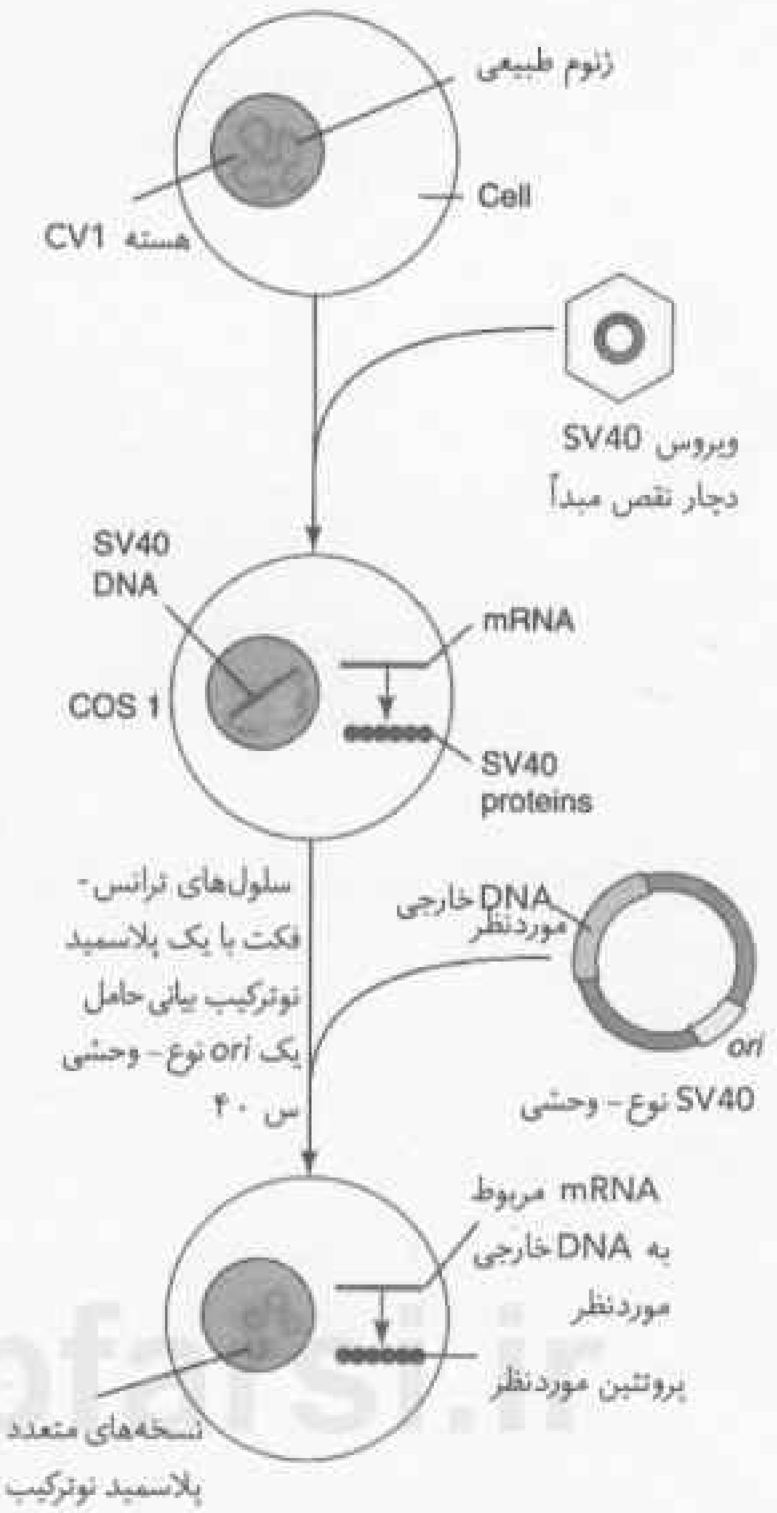
انتخاب سلول‌های اوکاریوتی ترانسفکت با استفاده از سلول‌های جهش‌یافته دارای نیازهای غذایی اختصاصی

رشد انتخابی سلول‌های ترانسفکت مهم است، زیرا اغلب شامل ۱۰٪ تا ۲۰٪ جمعیت می‌باشند. یک ژن می‌تواند در داخل سلولی قرار داده شود که سبب ایجاد مقاومت به یک دارو شده و یا یک قابلیت انتخابی رشد را فراهم می‌کند. این عمل با **کوترانسفکشن**[1] قابل انجام می‌باشد که در آن دو ناقل مختلف به شکل مؤثری توسط سلول‌ها برداشت می‌شوند که یکی حامل یک مارکر قابل انتخاب و دیگری حامل ژن موردنظر می‌باشد. در اکثر موارد، بیش از ۹۰٪ سلول‌های ترانسفکته هر دو ناقل را دارند. دو مارکر قابل انتخابی که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل ژن‌های تیمیدین کیناز (**tk**) و دی‌هیدروفولات ردوکتاز (**dhfr**) می‌باشند. تیمیدین کیناز در اکثر سلول‌های پستانداران بیان شده و در مسیر بازیافت تیمیدین همکاری می‌کند. چندین رده سلولی جهش‌یافته در دسترس قرار دارند که فاقد یک ژن تیمیدین کیناز وظیفه‌دار می‌باشند (**tk-**) و در محیط رشد حاوی هیپو-گزانتین، آمینوپترین و تیمیدین زنده نمی‌مانند. تنها سلول‌های جهش‌یافته **tk-** که با یک ناقل حامل یک ژن **tk** کوترانسفکته شده‌اند، معمولاً از ویروس هرپس سیمپلکس، در این محیط رشد خواهند کرد. در اکثر موارد، این سلول‌ها با ژن موردنظر کوترانسفکته شده‌اند.

دی‌هیدروفولات ردوکتاز غلظت سلولی تتراهیدروفولات را برای بیوسنتز نوکلئوتیدها حفظ می‌کند (ص ۱۰۸۳). سلول‌های فاقد این آنزیم تنها در محیط‌هایی قادر به ادامه حیات هستند که حاوی تیمیدین، گلیسین و پورین‌ها باشند. لذا سلول‌های جهش‌یافته (**dhfr-**) که با ژن **dhfr** ترانسفکت شده‌اند، به‌طور انتخابی در محیطی رشد می‌کنند که فاقد این مکمل‌ها هستند. بیان ژن‌های خارجی در سلول‌های جهش‌یافته، کوترانسفکت شده با مارکرهای قابل انتخاب، محدود به انواع سلولی با نقص ژنی مورد نیاز می‌باشد که قابل جداسازی باشند.

سلول‌های طبیعی که با یک ناقل حامل ژن **dhfr** ترانسفکت شده‌اند، نسبت به متوترکسات به عنوان مهارکننده دی‌هیدروفولات ردوکتاز مقاوم هستند و با رشد در حضور متوترکسات انتخاب می‌شوند. به‌طور مشابه، سلول‌های طبیعی ترانسفکت‌شده با یک ژن باکتریایی که آمینوگلیکوزید ′۳ - فسفوترانسفراز (**APH**) را کد می‌کنند، مقاوم به آنتی-بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی نظیر نئومایسین و کانامایسین هستند؛ اینها سبب مهار سنتز پروتئین هم در پروکاریوت‌ها و هم در اوکاریوت‌ها می‌شوند. از ناقلین حامل ژن **APH** به‌عنوان مارکر انتخابی هم در باکتری‌ها و هم در سلول‌های پستانداران استفاده می‌شود.

1. Cotransfection



شکل ۲۳-۷ بیان ژن‌های خارجی در سلول‌های COS اوکاریوتی. CV1، یک رده‌کشت سلول بافتی با منشأ میمونی، را می‌توان با همانندسازی لیتیک DNA ویروس میمونی SV40، عفونی و حمایت نمود. سلول‌ها با یک جهش‌یافته دارای نقص مبداء (ori) SV40 که به‌طور دائمی در داخل ژنوم سلول ‎-1 CV‎ اینتگریت می‌شود، عفونی می‌گردند. DNA عفونت‌یافته به ویروس، به‌طور پیوسته پروتئین‌هایی راکد می‌کند که می‌توانند به یک ori طبیعی SV40 اتصال یافته تا همانندسازی را تنظیم کنند. به‌دلیل نقص ori، DNA ویروسی اینتگریت‌شده تولید ویروس نخواهد کرد. هرچند، پروتئین‌های SV40 سنتزشده در رده سلولی CV-1 دائماً تغییریافته، ‎1- COS‎، می‌توانند همانندسازی پلاسمیدهای نوترکیبی حامل یک SV40 ori نوع -وحشی را به وضعیت با تعداد نسخه‌های بالا (به اندازه 10^5 ملکول در هر سلول) القاء کنند. ممکن است بتوان پروتئین خارجی سنتز شده در سلول‌های ترانسفکت‌شده را به طریق ایمونولوژیکی یا آنزیمی مورد جستجو قرار داد.

ژن‌های خارجی که در سلول‌های اوکاریوتی ترانسفورمه‌شده با ویروس بیان می‌شوند

شکل ۲۳-۷ بیان موقتی یک ژن ترانسفکت‌شده را در سلول‌های COS تشریح می‌کند؛ سلول‌های COS سیستمی است که معمولاً برای بیان ژن‌های اوکاریوتی خارجی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سلول‌های COS سلول‌های میمونی کشت‌شده هستند که با یک ژنوم SV40 با یک مبداء معیوب ترانسفکت شده‌اند. این ژنوم ویروسی معیوب در داخل ژنوم سلول میزبان قرار گرفته و دائماً پروتئین‌های ویروسی را بیان می‌کند. ویروس‌های عفونت‌زایی که به‌طور طبیعی برای سلول‌های عفونت‌یافته لیتیک هستند، تولید نمی‌شوند، زیرا مبداء ویروسی همانندسازی معیوب است. پروتئین‌های SV40 بیان‌شده توسط سلول COS ترانسفکت‌شده، با ori طبیعی SV40 موجود در یک ناقل ترانسفکت‌شده تعامل نموده و بنابراین همانندسازی مکرر ناقل را تسریع می‌کنند که ممکن است به تعداد نسخ مازاد 10^5 ملکول در هر سلول برسد. سلول‌های COS ترانسکفکت‌شده بعد از ۳ تا ۴ روز، احتمالاً به دلیل سرباری سمی DNA ناقل اپی‌زومی، می‌میرند.

۹-۷ • جهش‌زایی هدایت‌شده-جایگاهی

با ایجاد جهش در نواحی انتخاب‌شده یا نوکلئوتیدهای واحد در داخل DNA کلون‌شده، تعیین نقش توالی‌های DNA در تنظیم ژن و توالی‌های اسید آمینه‌ای در عملکرد پروتئین ممکن می‌باشد. **جهش‌زایی هدایت‌شده-جایگاهی**[1] تغییر کنترل‌شده نواحی انتخاب‌شده یک ملکول DNA می‌باشد. این تغییر ممکن است شامل الحاق یا حذف توالی‌های انتخابی DNA یا جایگزینی یک نوکلئوتید اختصاصی با یک باز متفاوت می‌باشد. انواع مختلفی از روش‌های شیمیایی سبب ایجاد جهش، معمولاً در محل‌های تصادفی در داخل این ملکول، می‌شوند.

نقش نواحی پهلویی DNA توسط جهش‌های حذفی و الحاقی ارزیابی می‌شوند

جهش‌زایی هدایت‌شده- جایگاهی در نواحی مختلفی از یک توالی DNA، شامل خود ژن یا نواحی پهلویی آن، انجام می‌شود. شکل ۲۴-۷ یک راهکار ایجاد جهش حذفی ساده را شرح می‌دهد که در آن توالی موردنظر به‌طور انتخابی توسط آندونوکلئاز محدودکننده شکسته شده، توالی‌های اختصاصی برداشت شده، و ناقل نوترکیب تغییریافته با استفاده از DNA لیگاز دوباره حلقوی می‌شود. نقش این توالی حذف‌شده را می‌توان با مقایسه میزان بیان (ترجمه) محصول ژن که به طریق ایمونولوژیکی یا آنزیمی اندازه‌گیری می‌شود، با ناقل بیانی نوترکیب تغییرنیافته تعیین نمود. حذف یک توالی DNA در داخل ناحیه پهلویی یک ژن

1. Site-directed mutagenesis

کلون‌شده می‌تواند نقش تنظیمی آن را در بیان ژن نشان دهد. آرایش فضایی عناصر تنظیمی نسبت به یکدیگر، به ژن و به پروموتر خود نیز ممکن است در تنظیم بیان ژن مهم باشد.

آنالیز یک توالی تنظیمی بالقوه مستلزم الحاق توالی فرادست یک ژن گزارشگر در یک ناقل بیانی می‌باشد. یک ژن گزارشگر، معمولاً با منشاء پروکاریوتی، پروتئینی را کد می‌کند که می‌توان آن را از پروتئین‌هایی تمایز داد که به‌طور طبیعی در سلول ترانسفکت‌نشده وجود دارد و می‌تواند به‌راحتی و به‌سرعت مورد آزمایش قرار گیرد. یکی از ژن‌های گزارشگری که معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرد، ژن کلرامفنیکل استیل‌ترانسفراز (CAT) باکتری‌ها می‌باشد. این آنزیم کلرامفنیکل را استیله و غیرفعال می‌کند که خود یک مهارکننده سنتز پروتئین در سلول‌های پروکاریوتی است. سپس اثر یک عنصر تنظیمی بر روی بیان ژن CAT را می‌توان تعیین نمود. می‌توان قبل از الحاق در داخل ناقل حامل ژن گزارشگر، در این عنصر تنظیمی جهش ایجاد کرد تا نیازهای فضایی و توالی این عنصر تعیین گردد.

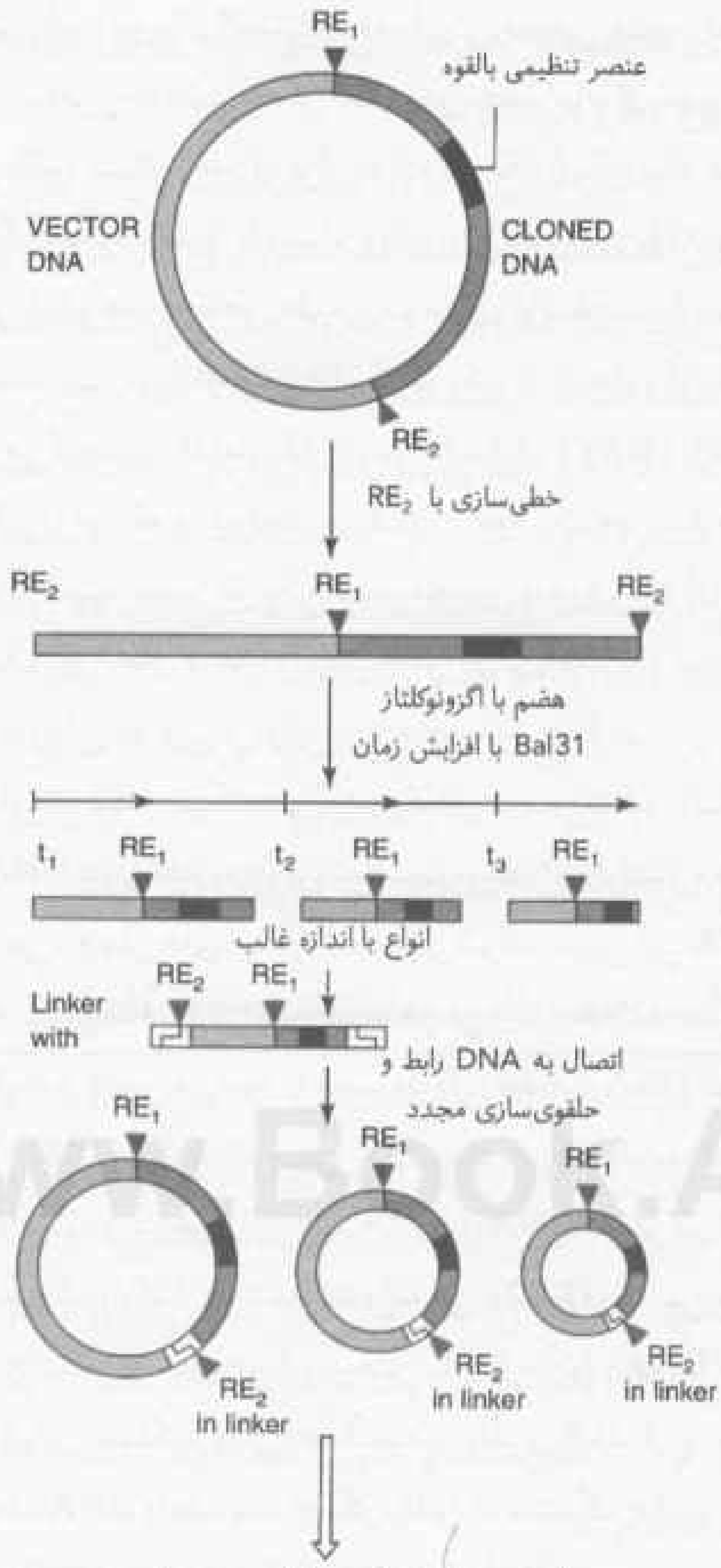
عناصر تنظیمی ممکن است فاقد جایگاه‌های آندونوکلئاز محدودکننده باشند. در چنین حالتی، با خطی‌سازی DNA کلون‌شده به طریق شکست توسط آندونوکلئاز محدودکننده در فرودست توالی تنظیمی، جهش‌های حذفی ایجاد می‌شوند. سپس این DNA با استفاده از یک اگزونوکلئاز که نوکلئوتیدها را از انتهای آزاد هر دو رشته DNA خطی‌شده برداشت می‌کند، به‌طور قرینه کوتاه و ناقص می‌شود. با هضم طولانی قطعات DNA کوچکتر به‌وجود می‌آیند. شکل ۲۵-۷ نشان می‌دهد که چطور حذف‌های بزرگتر (تولید قطعات کوچکتر) را می‌توان از نظر فعالیت مورد آزمون قرار داد. هیدرولیز DNA در هر دو انتهای ناقل خطی‌شده رخ داده و جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده ابتدایی (RE2) را از بین می‌برد. یک جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده بی‌همتا دوباره ایجاد شده تا ملکول DNA ناقص برای کارهای بعدی جهت ارزیابی عملکرد توالی حذف‌شده حلقوی گردد. این عمل با دوختن انتهاهای صاف به یک DNA رابط، یک اولیگونوکلئوتید سنتتیک حاوی یک یا چند جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده، انجام می‌شود. این رابط‌ها با آنزیم مناسبی بریده شده تا امکان دوختن و حلقوی‌شدن مجدد فراهم گردد.



شکل ۲۴-۷ استفاده از ناقلین بیانی برای مطالعه توالی‌های تنظیمی DNA. ژن مورد نظر با DNA فرادست و یا فرودست نواحی پهلویی DNA در داخل یک ناقل بیانی قرار داده شده و کلون می‌شود، و بیان ژن رده‌-پایه در یک سلول مناسب تعیین می‌شود. نواحی تعریف‌شده مربوط به توالی‌های تنظیمی بالقوه را می‌توان با شکست توسط آندونوکلئاز محدودکننده برداشت نمود، و ناقل DNA نوترکیب ناقص را می‌توان دوباره حلقوی، دوخت و به‌داخل یک سلول میزبان مناسب ترانس‌فکت نمود. میزان بیان ژن در غیاب تنظیم‌کننده بالقوه تعیین شده و برای مشخص نمودن نقش تنظیمی توالی DNA طرفی حذف‌شده با کنترل‌ها مقایسه می‌گردد.

جهش‌زایی هدایت‌شده-جایگاهی یک نوکلئوتید واحد

روش‌های اجرایی که قبلاً مورد بحث قرار گرفتند، می‌توانند نقش‌های وظیفه‌دار توالی‌های DNA را تشریح کنند. هر چند در اغلب موارد می‌خواهیم نقش یک نوکلئوتید موجود در یک محل انتخابی DNA را جهت ارزیابی نقش اسیدهای آمینه اختصاصی موجود در یک پروتئین مورد بررسی قرار دهیم (ارتباط بالینی ۱۰-۷). این روش امکان ایجاد یا تخریب یک جایگاه آندونوکلئاز محدودکننده در موقعیت‌های اختصاصی را فراهم می‌سازد. جهش‌زایی هدایت‌شده-جایگاهی یک نوکلئوتید اختصاصی یک فرایند چند مرحله‌ای است که با کلون‌سازی ژن طبیعی در یک باکتریوفاژ آغاز می‌شود (شکل ۲۶-۷). معمولاً از مجموعه

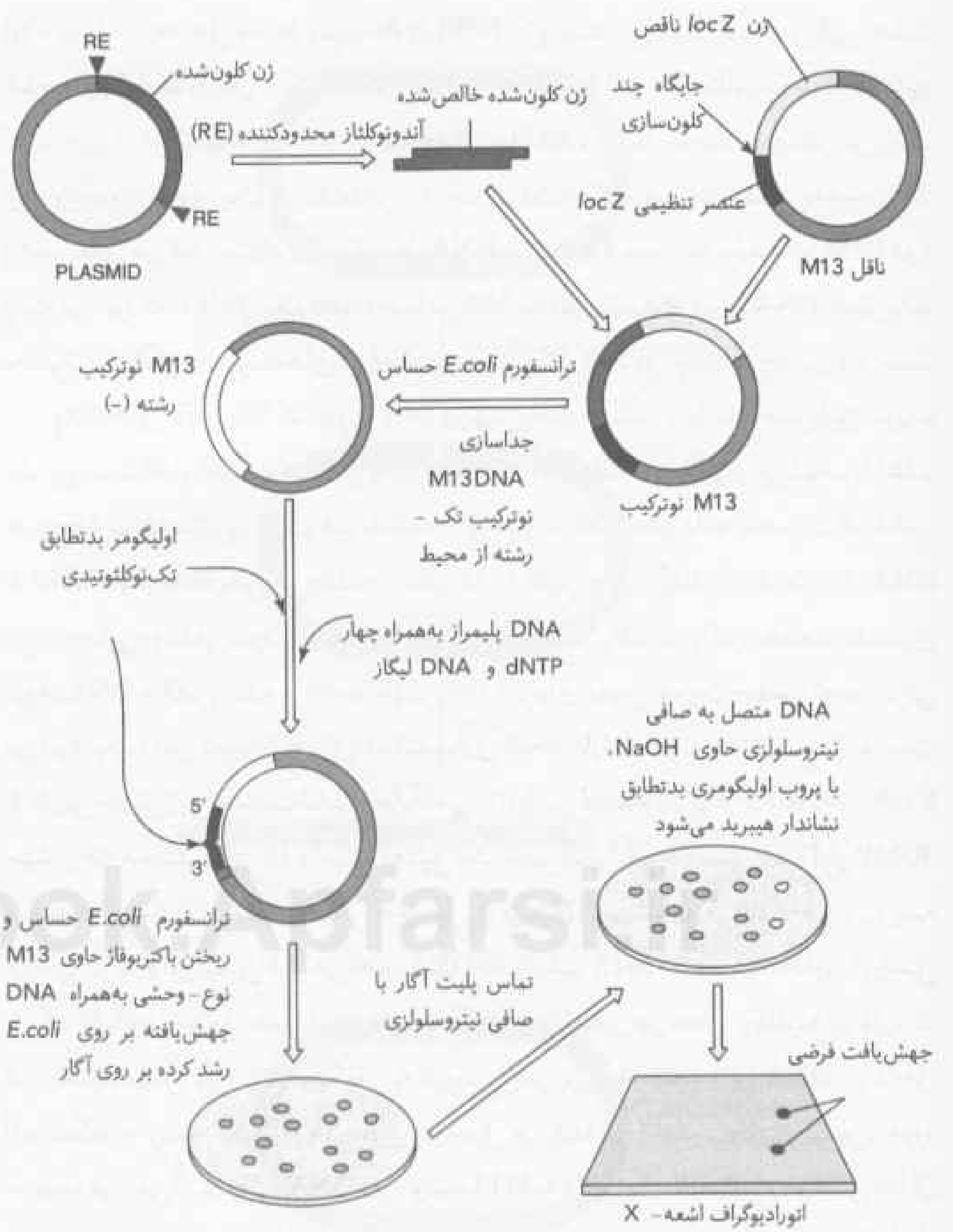


شکل ۲۵-۷ تغییر آنزیمی توالی‌های تنظیمی بالقوه DNA. یک ملکول خالص‌شده DNA نوترکیب دارای یک عنصر تنظیمی ژن موردنظر در داخل نواحی DNA پهلویی، توسط یک آندونوکلئاز محدود- کننده (RE_2) شکسته می‌شود. DNA نوترکیب خطی- شده برای دوره‌های مختلفی با اگزونوکلئاز، Bal31، هضم شده تا اندازه DNA پهلویی عنصر تنظیمی بالقوه کاهش یابد. به انتهای ملکول‌های DNA نوترکیب حاصل با اندازه‌های کوتاه‌شده مختلف، اولیگومرهای (رابط‌های) DNA کوچک حاوی یک توالی آندونوکلئاز محدودکننده برای RE_2 دوخته می‌شود. DNA تغییریافته خطی با RE_2 هیدرولیز شده تا انتهای چسبنده تک-رشته مکمل به‌وجود آیند که امکان حلقوی‌شدن مجدد را فراهم می‌سازند. عنصر تنظیمی بالقوه که توسط توالی‌های DNA پهلویی کوتاه شده احاطه شده است، را می‌توان تکثیر داد، خالص نمود و در فرادست یک ژن صلاحیت‌دار در یک ناقل بیانی قرار داد. سپس تغییر بیان ژن در یک سلول ترانسفکت‌شده مناسب را می‌توان با ارزیابی نقش عنصر تنظیمی بالقوه قراردادشده در فواصل مختلف نسبت به ژن، زیرنظر گرفت.

M13 ناقلین باکتریوفاژ نوترکیب استفاده می‌گردد. این باکتریوفاژ فیلمانی به‌طور اختصاصی *E.coli* مذکر [1] را عفونی می‌کند که پیلی جنسی (فاکتور F) را بیان می‌کند که توسط یک پلاسمید کد می‌شود. باکتریوفاژ M13 حاوی DNA به صورت یک تک-رشته یا شکل همانندساز [2] می‌باشد که در داخل سلول عفونت‌یافته به DNA دو ـ رشته همانندسازی می‌شود. این شکل دو-رشته از سلول‌های عفونت‌یافته جدا شده و برای کلون‌سازی ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد که قرار است در آن ایجاد جهش شود. پلاک‌های مورد نظر به طریق تکمیل‌سازی α (ص ۳۶۵) تعیین هویت می‌شوند.

از M13 نوترکیب برای ایجاد عفونت در *E.coli* حساس استفاده می‌شود. باکتریوفاژ

1. *E.coli*-Male 2. Replicative form



شکل ۲۶-۷ جهش‌زایی هدایت‌شده- جایگاهی یک نوکلئوتید واحد و DNA جهش‌یافته. این شکل یک مرور ساده شده این روش است. فرایند مستلزم الحاق یک قطعه DNA ازدیادیافته خالص به‌داخل یک ناقل باکتریوفاژی تغییریافته، M13، می‌باشد. *E.coli* حساس که با M13 DNA ترانسفورمه شده است، رشته (+) DNA بسته‌بندی‌شده در داخل پروتئین‌های باکتریوفاژ ویریونی را سنتز می‌کند. باکتریوفاژها از محیط رشد جدا می‌شوند و M13 DNA نوترکیب تک- رشته خالص می‌گردد. M13 DNA نوترکیب به عنوان یک الگو برای همانندسازی DNA توسط DNA پلیمراز، داکسی‌ریبونوکلئوزید تری‌فسفات‌ها (dNTPs)، DNA لیگاز، و یک پرایمر خاص عمل می‌کند. پرایمر DNA (اولیگومر بدتطابق) طوری ساخته می‌شود که دقیقاً مکمل یک ناحیه از DNA (ژن) موردنظر باشد، به غیر از این که یک باز آن تغییریافته (جهش‌یافته) باشد. M13DNA تازه سنتزشده که یک باز جهش‌یافته اختصاصی دارد، در هنگام ارائه به‌داخل یک *E.coli* حساس به‌طور صحیحی همانندسازی می‌شود. *E.coli* ترانسفورمه‌شده بر روی پلیت‌های آگار رشد داده شده و المثنی‌هایی از کلونی‌های حاصل بر روی صافی نیتروسلولزی انتقال داده می‌شوند. DNA موجود در هر کلونی با استفاده از NaOH دناتوره و به صافی ثابت می‌گردد و سپس DNA اتصال‌یافته به صافی با یک پروب اولیگومری DNA بدتطابق نشاندار با ^{32}P هیبرید می‌شود. سپس جهش‌های فرضی به‌دنبال تماس صافی با اشعه-X شناسایی می‌شوند.

ارتباط بالینی ۱۰-۷

جهش‌زایی هدایت‌شده - جایگاهی کلاژن نوع (C7) VIII

اپیدرمولیز بلوزا دیس‌مورفیک[1] (DEB) (OMIM ۲۲۶۶۰۰) یک بیماری ژنتیکی حاصل از جهش در ژن COL7A1 می‌باشد که کلاژن نوع VII (C7) را کد می‌کند. ملکول هتروتریمری C7 یک جزء مهم فیبریل‌های لنگراندازی است که غشاء پایه پوست را به درم پاپیلاری زمینه‌ای متصل می‌کند. پروتئین‌های جهش‌یافته COL7A1 منجر به کاهش تعداد فیبریل‌های لنگرانداز می‌شود. بیش از ۳۰۰ جهش متفاوت در داخل ژن COL7A1 مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که ارتباط کمی بین ژنوتیپ و فنوتیپ بیماری دارند. مبتلایان به DEB برحسب نوع جهشی که دارند، بیماری را با شدت‌های ملایم و شدید نشان می‌دهند. تمامی بیماران درجاتی از ایجاد تاول، اسکار، و درگیری پوست را دارند. از جهش‌زایی هدایت‌شده جایگاهی برای تولید چهار جهش اسید آمینه‌ای مختلف واحد استفاده شد. آنگاه از این پروتئین‌های جهش‌یافته C7 نوترکیب خالص‌شده برای بررسی خصوصیات عملکردی این پروتئین‌ها در آزمایشگاه استفاده شد که مشخص گردید با فنوتیپ‌های بالینی بیماران DEB ارتباط دارند.

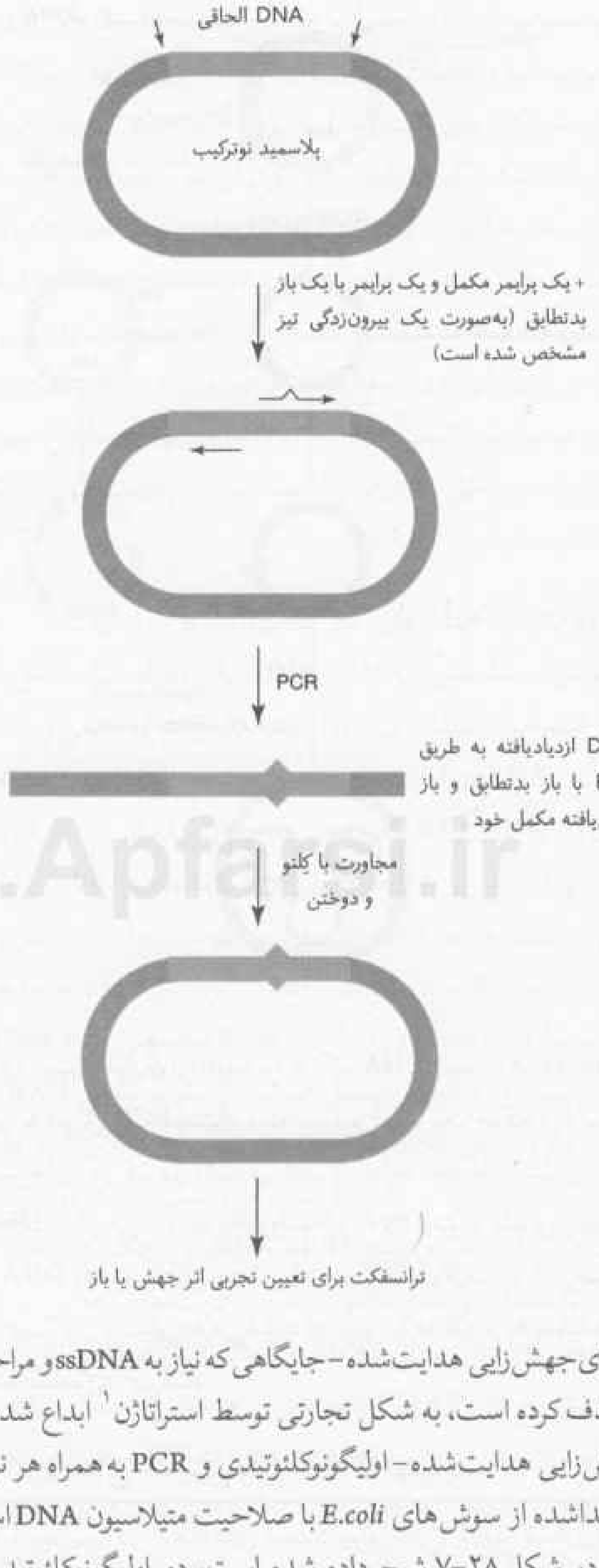
1. Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB)

اولاد آزاد شده به داخل محیط رشد، حاوی DNA تک-رشته می‌باشد. در **جهش‌زایی هدایت شده- اولیگونوکلئوتیدی**[1] یک اولیگونوکلئوتید (به طول ۱۸ تا ۳۰ نوکلئوتید) سنتز می‌شود که به غیر از نوکلئوتیدی که قرار است جهش پیدا کند، مکمل ناحیه مورد نظر می‌باشد. این اولیگومر، حاوی یک باز بدتطابق، با یک ژن تک-رشته هیبرید شده و به‌عنوان یک پرایمر عمل می‌کند. امتداد پرایمر توسط DNA پلیمراز T4 منجر به تولید یک DNA دو-رشته می‌شود که به داخل یک *E.coli* حساس انتقال داده می‌شود که در آن DNA جهش‌یافته به‌عنوان یک الگو برای رشته‌های (+) جدید عمل می‌کند که حامل نوکلئوتید جهش‌یافته است.

پلاک‌های باکتریوفاژ که حاوی DNA جهش‌یافته هستند، به‌واسطه هیبریدیزاسیون با یک پروب نشاندار اولیگونوکلوئیدی حامل نوکلئوتید تغییریافته، غربالگری می‌شوند. با تنظیم درجه حرارت شستشوی پروب هیبریدشده، تنها هیبرید کاملاً تطابق‌یافته به صورت کمپلکس با DNA جهش‌یافته باقی می‌ماند، در حالی که اولیگومر حاوی نوکلئوتید بدتطابق از DNA نوع-وحشی جدا می‌شود. سپس M13 حامل ژن جهش‌یافته در باکتری‌ها همانندسازی کرده، DNA خالص شده و ناحیه جهش‌یافته ژن برای تعیین هویت جهش تعیین توالی می‌شود. یک روش تغییریافته برای همانندسازی انتخابی رشته جهش‌یافته ابداع شده است تا کارایی جهش‌زایی هدایت‌شده- جایگاهی را افزایش دهد. باکتریوفاژ M13 که در *E.coli* جهش‌یافته همانندسازی شده است، به دلیل یک نقص متابولیکی در سنتز dTTP از dUMP و کمبود آنزیمی که به‌طور طبیعی اوراسیل را از DNA برداشت می‌کند، چندین ریشه اوراسیل را به جای تیمین قرار می‌دهد. DNA تک-رشته M13 خالص‌شده حاوی اوراسیل با یک اولیگومر مکمل هیبرید می‌شود که یک باز بدتطابق در محل نوکلئوتیدی دارد که قرار است جهش یابد. این اولیگومر به عنوان پرایمر برای همانندسازی DNA در داخل آزمایشگاه با رشته الگوی (+) حاوی اوراسیل و رشته (-) جدید حاوی تیمین، مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقتی DNA دو- رشته M13 به داخل یک *E.coli* نوع-وحشی انتقال داده می‌شود، رشته حاوی اوراسیل تخریب و رشته (-) به عنوان الگو برای باکتریوفاژ اولاد عمل می‌کند که اکثر آنها حامل جهش مورد نظر هستند.

PCR نیز برای جهش‌زایی هدایت‌شده- جایگاهی به‌کار می‌رود. راهکارهایی برای قراردادن یک باز بدتطابق در داخل یکی از اولیگونوکلئوتیدهایی ابداع شده‌اند که به‌عنوان پرایمر در شروع PCR به‌کار می‌روند. برخی از این روش‌ها از باکتریوفاژ M13 استفاده می‌کنند و تابع اصول شرح داده شده در شکل ۲۷-۷ می‌باشند. از **جهش‌زایی PCR معکوس**[2] برای پلاسمیدهای نوترکیب کوچک (۵-۴ kb) استفاده شده است. این روش بسیاری سریع بوده و ۵۰٪ تا ۱۰۰٪ کلونی‌های تولیدی حاوی توالی جهش‌یافته هستند. دو پرایمر طوری سنتز می‌شوند که پشت-به-پشت با یک پرایمر حامل باز بدتطابق جفت می‌شوند.

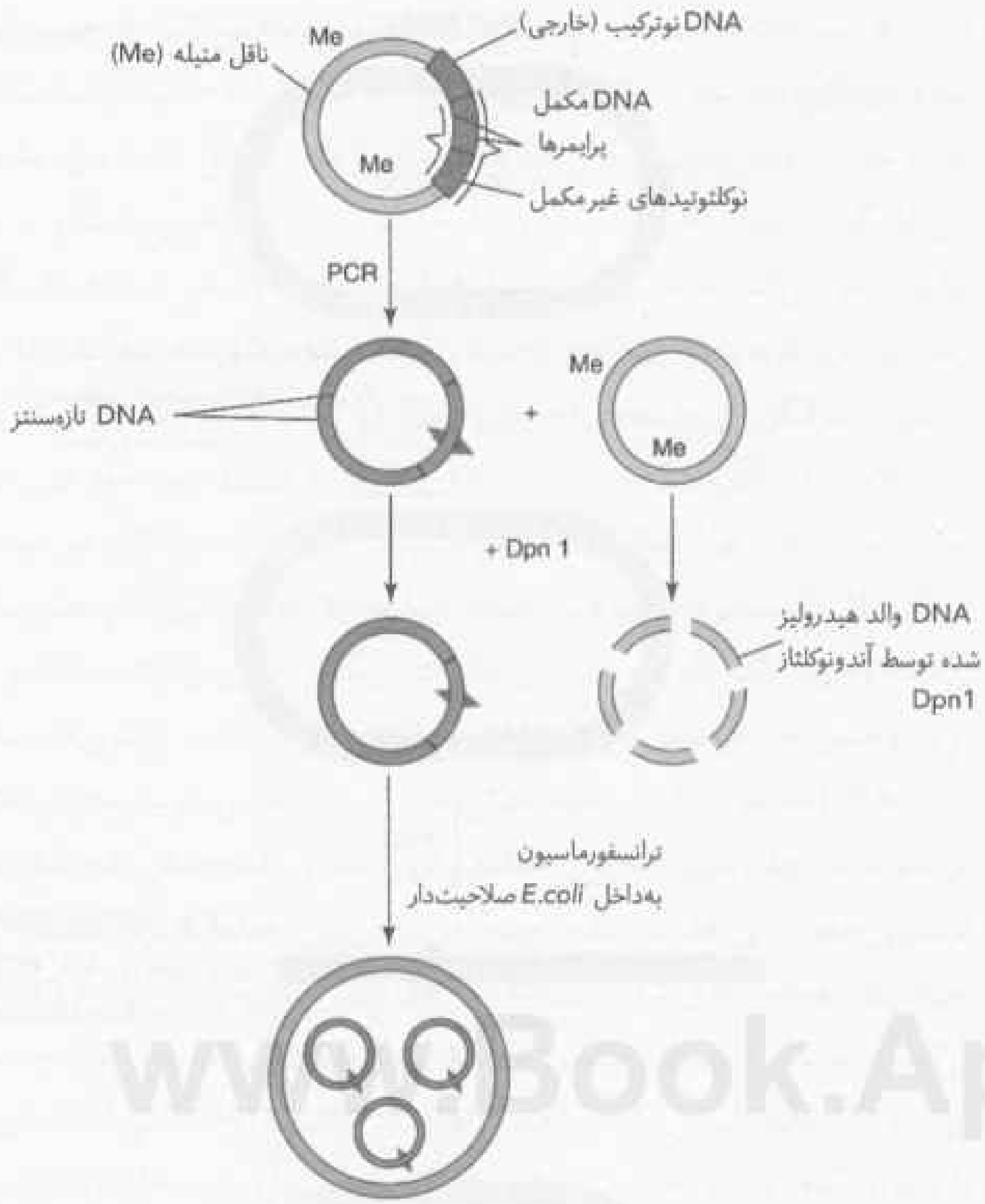
1. Oligonucleotide-directed mutagenesis   2. Inverse PCR mutagenesis



شکل ۲۷-۷ **جهش‌زایی PCR معکوس.** یک باز را می‌توان در پلاسمیدهای DNA نوترکیب به طریق PCR معکوس جهش‌دار نمود. دو پرایمر طوری سنتز می‌شوند که انتهاهای ′5 موازی ناهمسوی آنها مکمل بازهای مجاور موجود در دو رشته DNA باشند. یکی از این دو پرایمر یک باز بدتطابق اختصاصی دارد که به‌طور صحیحی طی مراحل ازدیاد PCR نسخه‌برداری شده و نهایتاً تولید یک پلاسمید نوترکیب با یک باز جهش‌یافته می‌کند.

روشی برای جهش‌زایی هدایت‌شده-جایگاهی که نیاز به ssDNA و مراحل آزمایشگاهی انتخاب را حذف کرده است، به شکل تجارتی توسط استراتاژن[1] ابداع شده است. در این فرایند از جهش‌زایی هدایت‌شده-اولیگونوکلئوتیدی و PCR به همراه هر نوع ناقل DNA پلاسمیدی جداشده از سوش‌های *E.coli* با صلاحیت متیلاسیون DNA استفاده می‌شود. همان‌طورکه در شکل ۲۸-۷ شرح داده شده است، دو اولیگونوکلئوتید مکمل، حامل نوکلئوتید تغییریافته مورد نظر، با ناحیه‌ای از یک DNA کلون‌شده قرارگرفته در داخل

1. Stratagene



شکل ۲۸-۷ جهش‌زایی هدایت‌شده- جایگاهی DNA دو-رشته. یک ملکول DNA نوترکیب می‌تواند در یک جایگاه انتخابی با سنتز پرایمرهای مکملی که هر کدام یک نوکلئوتید غیرمکمل با رشته DNA والد دارند ولی مکمل یکدیگر هستند، جهش‌یافته شود. این پرایمرها توسط PCR طوری امتداد داده می‌شوند که برش‌هایی (X) در هر رشته باقی بماند که به‌دنبال ترانسفورماسیون به‌داخل *E.coli* صلاحیت‌دار دوخته می‌شود. قبل از ترانسفورماسیون، DNA متیله (Me) والد با هیدرولیز توسط آندونوکلئاز Dpn I برداشت می‌شود.

ناقل سرد می‌گردد. سپس اولیگونوکلئوتیدها با یک DNA پلیمراز **Phusion-type** بدون جایگزینی پرایمر به طریق PCR امتداد داده شده و تولید یک ملکول پلاسمید نوترکیب جهش‌یافته با برش‌هایی در هر دو رشته می‌کند. در ادامه مخلوط واکنش در معرض یک آندونوکلئاز، *Dpn-I*، قرار می‌گیرد که به‌طورانتخابی DNA متیله مادری (جهش‌نیافته) را هضم می‌کند. DNA پلاسمیدهای جهش‌یافته برش‌دار باقیمانده (غیرمتیله) به داخل سلول‌های صلاحیت‌دار ترانسفورمه می‌شوند که برش را دوخته و پلاسمیدهای نوترکیب جهش‌یافته را همانندسازی می‌کنند.

۱۰-۷ • کاربردهای فناوری‌های DNA نوترکیب

روش‌های DNA نوترکیب در عرصه‌های متعدد بیولوژیکی، شامل کشاورزی، مطالعات تکاملی، بیولوژی پزشکی قانونی و پزشکی بالینی، کاربرد دارند. مهندسی ژنتیک می‌تواند پروتئین‌های جدید یا تغییریافته‌ای را در محصولات کشاورزی (برای مثال، ذرت) به‌وجود آورد که حاوی اسیدهای آمینه ضروری برای انسان باشند که اغلب در پروتئین‌های گیاهی

وجود ندارند. سمومی که برای حشرات خاصی کشنده هستند ولی برای انسان بی‌ضرر می‌باشند را می‌توان به محصولات کشاورزی ارائه داد تا از گیاهان محافظت کنند و بدین ترتیب دیگر از حشره‌کش‌هایی استفاده نشود که به محیط آسیب می‌رسانند. DNA سلول‌های موجود در مایع آمنیوتیک یک زن باردار را می‌توان از نظر وجود نقص‌های ژنتیکی در جنین مورد آنالیز قرار داد. مقادیر بسیار ناچیز DNA جداشده از نمونه‌های بیولوژیکی حفظ شده در گودال‌های قیر[1] باستانی یا محل‌های سرد منجمد، برای مطالعات تکاملی، ازدیاد و تعیین توالی شده‌اند. DNA مربوط به یک تار مو، یک قطره خون، یا اسپرم مرتبط با قربانی یک تجاوز را می‌توان برای اهداف قانونی، جدا نمود، تکثیر داد و نقشه‌برداری کرد. بهبود تکنولوژی‌های موجود می‌بایست امکان ارائه انتخابی ژن‌ها به داخل سلول‌های ناقص و اسیدهای نوکلئیک به داخل سلول‌های اختصاصی را در جهت مهار انتخابی بیان ژن‌های مضر فراهم سازند.

اسیدهای نوکلئیک ضدمعنی در تحقیقات و درمان

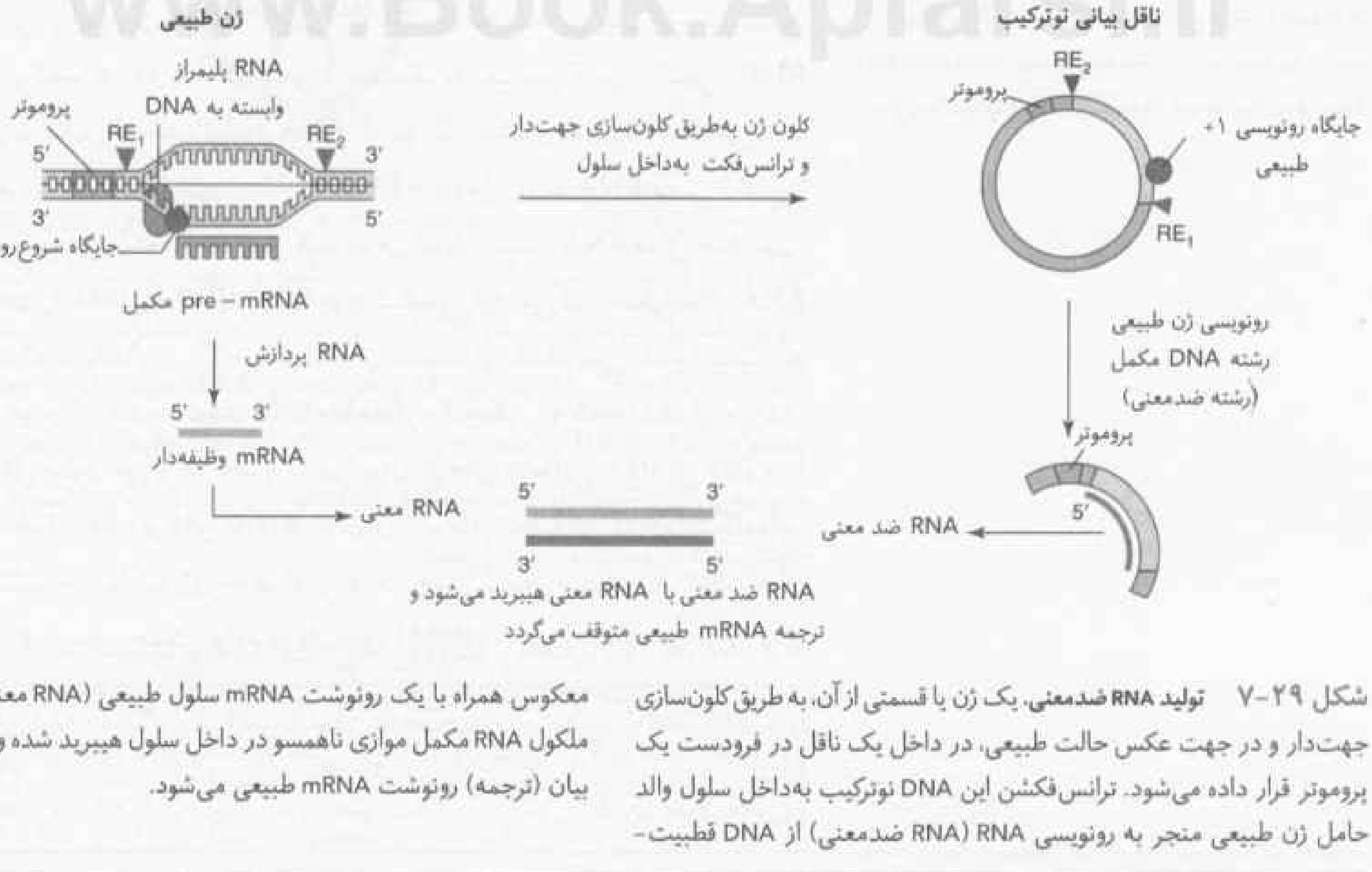
از **اسیدهای نوکلئیک ضدمعنی**[2] (RNA یا DNA) برای مطالعه بیان داخل سلولی و عملکرد پروتئین‌های اختصاصی استفاده می‌شود. اسیدهای نوکلئیک طبیعی و ضدمعنی که مکمل mRNA هستند، mRNA را غیرفعال نموده و ترجمه را متوقف می‌سازند. صدها، شاید هزاران، ملکول ریز RNA[3] (RNA ضدمعنی) توسط ژنوم انسانی کد می‌شوند. هر نوع سلول، مجموعه متفاوتی از این ریز RNAها را بیان می‌کند که به‌طور انتخابی بیان ژن را در سطح RNA تنظیم می‌کنند. هر دو RNA طبیعی و سنتتیک به یک کمپلکس پروتئینی، RISC (کمپلکس فرونشاننده القاءشده توسط RNA[4])، پردازش شده و یا مرتبط با آن می‌باشد که اولیگومر تقریباً ۲۱ نوکلئوتیدی (۲۱ مر) RNA ضدمعنی را به RNA معنی (معمولاً mRNA) ارائه نموده و رشته‌های مکمل هیبرید می‌شوند. سپس RNA معنی /ضدمعنی برای تخریب /مهار (**تداخل RNA**[5] [RNAi]) مورد شناسایی قرار می‌گیرد. ملکول‌های RNA طبیعی یا سنتتیک که بلندتر از ۲۱ مر هستند، می‌بایست توسط آنزیمی به‌نام دایسر[6] به اندازه مناسب هیدرولیز شده و تولید **RNA مداخله‌گر - کوچک**[7] (siRNA) کند. ارائه پایدار siRNA به داخل سلول می‌تواند به‌طور دائمی بیان ژن‌های انتخابی را کاهش داده و یا کم‌توان[8] کند. اخیراً از فناوری‌های RNAi به عنوان یک ابزار تحقیقاتی در آزمایشگاه‌های متعدد جهت تشریح عملکرد ژن اختصاصی و همچنین توسط بسیاری از شرکت‌های دارویی و فناوری‌زیستی جهت تولید درمان‌های RNAi- محور استفاده می‌شود. ارائه اسیدهای نوکلئیک ضدمعنی به داخل سلول، بزرگراه‌های جدیدی را در جهت کاوش پیرامون نحوه عملکرد پروتئین‌های سرکوب‌شده انتخابی در داخل آن سلول باز کرده است. همچنین امید زیادی وجود دارد که با این روش بتوان عفونت‌های ویروسی را کنترل نمود. فناوری

1. Tar pits 2. Antisense nucleic acids 3. Micro RNA 4. RNA-induced silencing complex 5. RNA interferance
6. Dicer 7. Smal-interfering RNA 8. Knockdown

ضدمعنی و جهش‌زایی هدایت‌شده- جایگاهی قسمت‌هایی از **ژنتیک معکوس**[1] (از ژن به فنوتیپ) هستند که به‌طور انتخابی ژن را جهت ارزیابی عملکرد آن تغییر می‌دهد، در حالی که ژنتیک کلاسیک بستگی به جداسازی و آنالیز سلول‌های حامل جهش‌های تصادفی دارد که می‌توان آنها را شناسایی نمود. کاربرد دیگر ژنتیک معکوس اشاره به نقشه‌برداری و کلون‌سازی نهایی یک ژن انسانی مرتبط با یک بیماری دارد که عوامل ملکولی آنها هنوز ناشناخته هستند.

RNA ضدمعنی به‌وسیله تکنیک‌های کلون‌سازی معمول به‌داخل سلول‌ها ارائه می‌شود. شکل ۲۹-۷ یک ژن کلون‌شده را در یک ناقل بیانی در فرودست یک پروموتر ولی در جهت مخالف حالت طبیعی، نشان می‌دهد. به این ترتیب رشته مکمل یا ضدمعنی DNA را تحت کنترل پروموتری قرار می‌دهد که همراه با بیان یا رونویسی RNAضدمعنی می‌باشد. به‌دنبال ترانسفکشن سلول‌ها با ناقل بیانی ضدمعنی، تولید RNA ضدمعنی می‌شود که با mRNA طبیعی هیبرید می‌گردد. به‌چند دلیل، نظیر ناتوانی در اتصال به ریبوزوم، جلوگیری از پردازش طبیعی و تجزیه آنزیمی سریع، این کمپلکس RNA-mRNA ضدمعنی ترجمه نمی‌شود.

اولیگونوکلئوتیدهای DNA ضدمعنی سنتتیکی تولید شده‌اند که مانع عفونت‌های ویروسی، شامل عفونت ناشی از ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)، می‌شوند. سلول‌های



شکل ۲۹-۷ **تولید RNA ضدمعنی.** یک ژن یا قسمتی از آن، به طریق کلون‌سازی جهت‌دار و در جهت عکس حالت طبیعی، در داخل یک ناقل در فرودست یک پروموتر قرار داده می‌شود. ترانس‌فکشن این DNA نوترکیب به‌داخل سلول والد حامل ژن طبیعی منجر به رونویسی RNA (RNA ضدمعنی) از DNA قطبیت- معکوس همراه با یک رونوشت mRNA سلول طبیعی (RNA معنی) می‌شود. دو ملکول RNA مکمل موازی ناهمسو در داخل سلول هیبرید شده و منجر به توقف بیان (ترجمه) رونوشت mRNA طبیعی می‌شود.

1. Reverse genetics

مغز استخوان از مبتلایان به ایدز جدا و اسیدهای نوکلئیک ضدمعنی HIV به داخل آنها ارائه می‌شود. سپس این سلول‌های حفاظت‌شده دوباره به داخل سلول میزبان ارائه شده و جایگزین سلول‌هایی می‌شوند که به‌طور طبیعی توسط این ویروس از بین می‌روند. پیشرفت‌هایی با اسیدهای نوکلئیک ضدمعنی حاصل شده است که بیان اونکوژن‌ها را تنظیم می‌کنند که در ایجاد سرطان نقش دارند. فناوری‌های ضدمعنی مجهز امیدهای زیادی را برای درمان بیماری‌ها به‌وجود آورده‌اند (ارتباط بالینی ۱۱–۷). با وجود اینکه مطالعات زیادی با استفاده از siRNA حاوی ۲۱ باز جهت آغاز RNAi انجام شده است، اخیراً نشان داده شده است که استفاده از ملکول‌های RNA ضدمعنی دو–رشته قدری بلندتر که به همین دلیل سوبستراهایی برای دایسر هستند، مهارکننده‌های مؤثرتری برای بیان ژن هستند. معتقدند که این موضوع به دلیل همکاری دایسر همراه با تشکیل کمپلکس RISC می‌باشد (ارتباط بالینی ۱۱B–۷).

تکنیک‌های ملکولی مورد استفاده برای حیوان کامل

همان‌طور که شرح داده شد، بسیاری از سیستم‌های داخل آزمایشگاهی و داخل‌سلولی سبب تسهیل در خالص‌سازی، تعیین توالی و تغییر ژن‌ها و ملکول‌های cDNA آنها یا

ارتباط بالینی ۱۱–۷

تنظیم بیان ژن به‌واسطه siRNA

A آپتامر – siRNA برای درمان HIV

استفاده از RNA مداخله‌گر، siRNA، (RNA ضدمعنی) در تنظیم بیان پروتئین‌های HIV-1 در سلول‌های بیمار، نیازمند تحویل کارآمد siRNA به سلول‌های هدف است. یک آپتامر برای شناسایی و اتصال انتخابی به gp120 (گلیکوپروتئین ۱۲۰) مهندسی شده است. gp120 یک پروتئین HIV-1 است که بر روی غشاء سلول‌های عفونت‌یافته بیان می‌شود. یک آپتامر ملکول اسید نوکلئیکی است که می‌تواند به‌طور انتخابی به ملکول‌های هدفی نظیر پروتئین‌های اختصاصی اتصال یابد. ملکول‌های کایمری آپتامر ضد gp120 و siRNA ضد tat/rev با اتصال کووالان این دو قطعه تولید شدند. siRNA یک ۲۷–مری است که به عنوان یک سوبسترای دایسر عمل می‌کند. آپتامر – siRNA به‌طور انتخابی توسط HIV-1 در سلول‌های عفونت‌یافته بیان‌کننده gp120 برداشت شد. سپس siRNA ۲۷–مری توسط دایسر در داخل سلول پردازش شد تا یک siRNA ضد tat/rev ۲۱–مری تولید شود. کم‌توان‌سازی بیان ژن‌های tat/rev HIV-1 همراه با اثر ضدویروسی آپتامر ضد gp120 یک اثر مهاری مرکب بر روی همانندسازی HIV-1 دارد. استفاده از کایمرهای آپتامر – siRNA امید زیادی را برای درمان سیستمیک عفونت‌های HIV و سایر بیماری‌هایی به وجود می‌آورد که مارکرهای هدف سطحی بالقوه را نمایان می‌کنند.

B استفاده از siRNA سوبسترا– دایسر برای تحقیق درد

اکثر داروهایی که امروزه به فروش می‌رسند و بر روی سیستم عصبی مرکزی (CNS) عمل می‌کنند، برای درمان درد هستند. دو کلاس اصلی داروهای ضد درد شامل اوپیوئیدها و داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی می‌باشند. همچنین به‌دنبال درمان درد مزمن، همه این داروها اغلب غیرمؤثر می‌شوند و یا قدرت خود را از دست می‌دهند. در یک مدل نشان داده شده است که گیرنده جفت‌شده با پروتئین G، NTS2، موجود در CNS در انتقال پیام درد نقش دارد. از RNAi (تداخل RNA) برای کم‌توان‌سازی بیان ژن NTS2 در موش خانگی استفاده شد. مشخص گردید که استفاده از یک ۲۷–مری (RNA ضدمعنی برای NTS2 mRNA) که به عنوان یک siRNA دایسر– سوبسترا (DsiRNA) عمل می‌کند، به شکل مؤثری بیان NTS2 را سرکوب نمود. این DsiRNA در یک لیپیدی کاتیونی، h-Fect، معلق شد و به طریق تزریق داخل‌جلدی، به طناب نخاعی موش صحرایی تجویز شد. تجویز دوز پایین DsiRNA سبب تخفیف درد برای ۳ تا ۴ روز شد که با کم‌توان سازی پروتئین گیرنده NTS2 طی همان دوره زمانی ارتباط داشت. این نوع درمان با DsiRNA ممکن است نهایتاً به کاهش درد مزمن سرکش در انسان کمک کند.

نواحی DNA پهلویی ژن‌ها با پتانسیل فعالیت تنظیمی می‌شوند. ارائه ژن‌های خارجی به داخل حیوان کامل، حذف یک ژن از کل ژنوم حیوانی، و کلون‌سازی یک انسان کامل صورت گرفته است. با وجود اینکه در هنگام استفاده از برخی از این روش‌ها لازم است به چهارچوب‌ها و موضوعات اخلاق-زیستی واضح توجه شود، خود این روش‌ها امیدهای زیادی را برای درمان در آینده فراهم می‌کنند.

ژن درمانی: ژن‌های طبیعی را می‌توان به داخل سلول‌هایی ارائه داد که یک ژن ناقص دارند

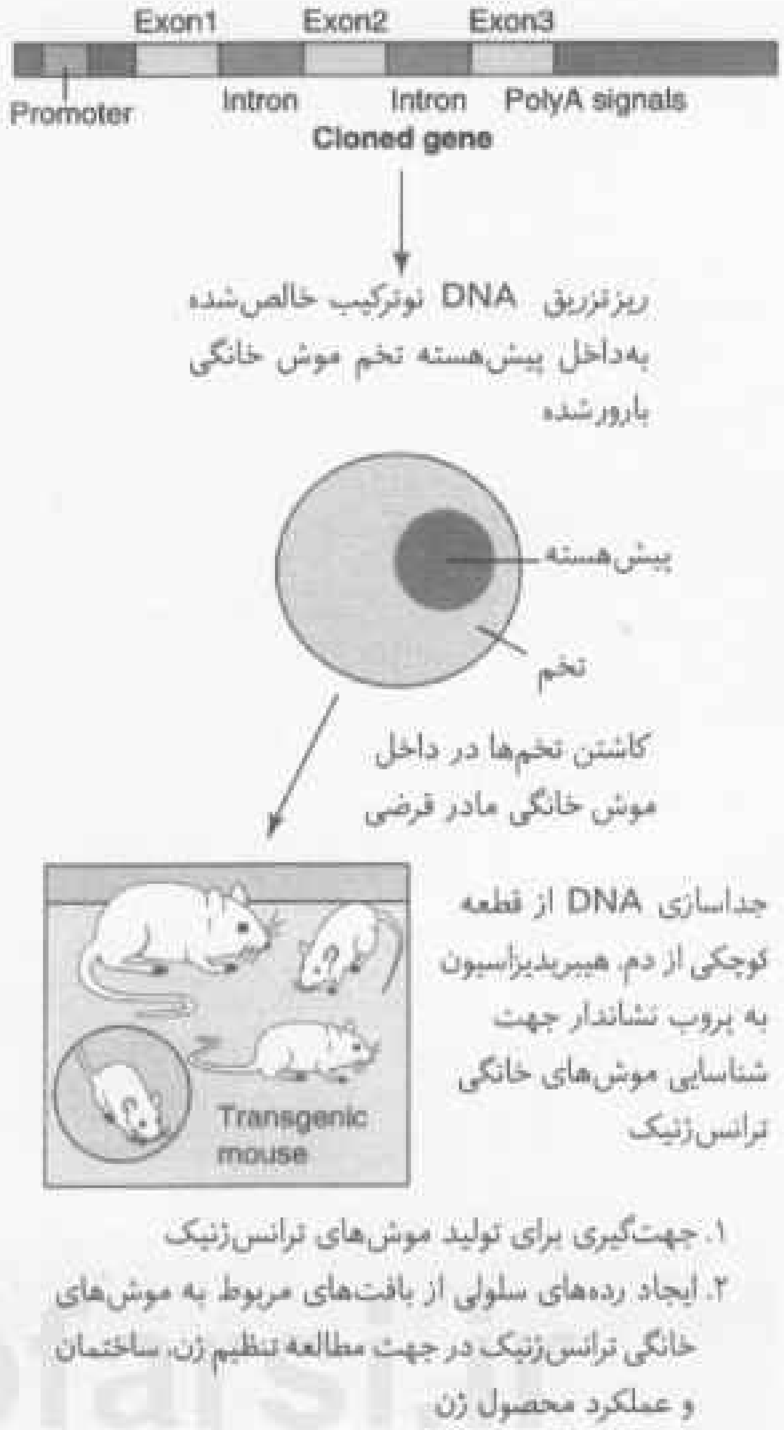
افرادی که ژن ناقصی دارند که منجر به یک حالت ناتوان‌کننده یا کشنده می‌شود را از نظر تئوری می‌توان با قراردادن یک ژن طبیعی در سلول‌های آنها درمان نمود. **ژن درمانی**، انتقال یک ژن طبیعی به انسان، با استفاده از رتروویروس‌ها انجام شده است (ارتباط بالینی ۱۲-۷). موفقیت انتقال ژن تا حدودی بستگی به قرارگیری این ژن در داخل ژنوم میزبان دارد که توسط سیستم قراردهی رتروویروسی هدایت می‌شود. هر چند، قرارگیری در داخل ژنوم یک رویداد تصادفی است که می‌تواند عواقب مصیبت باری را به دنبال داشته باشد. مطالعات نشان می‌دهند که ماشین قراردهی ویروسی از طریق تعاملات پروتئین-پروتئین جهت برطرف‌سازی این مشکلات بالقوه، به‌طور انتخابی با توالی‌های هدف اختصاصی در داخل DNA میزبان ارتباط برقرار می‌کند.

حیوانات ترانس‌ژنیک

برای بررسی نقش محصول یک ژن انتخابی در رشد و نمو کل حیوان، این ژن را می‌بایست به تخم بارورشده ارائه داد. حیواناتی که از چنین تخم بارورشده‌ای به وجود می‌آیند، حاوی ژن الحاقی در تمامی سلول‌های خود بوده و تحت عنوان **حیوانات ترانس‌ژنیک** مورد اشاره قرار می‌گیرند.

شکل ۳۰-۷ یک روش معروف برای تولید حیوانات ترانس‌ژنیک را نشان می‌دهد. ژن مورد نظر معمولاً یک ملکول DNA نوترکیب کلون‌شده همراه با پروموتر خود است و یا با پروموتر متفاوتی کلون شده است که به‌طور انتخابی تنظیم می‌شود. نسخه‌های متعدد به داخل پیش‌هسته[1] تخم بارور شده به طریق ریزتزریق ارائه می‌گردد. DNA خارجی به‌طور تصادفی در داخل DNA کروموزومی قرار می‌گیرد. در صورتی که این الحاق سبب قطع یک ژن مهم سلولی شود، رویان خواهد مرد. معمولاً حوادث جهش‌زای غیرکشنده از الحاق DNA خارجی به داخل کروموزوم حاصل می‌شوند.

هم اکنون از حیوانات ترانس‌ژنیک برای مطالعه عناصر تنظیمی DNA، بیان پروتئین‌ها در هنگام تمایز، ویژگی بافتی و نقش محصولات اونکوژن در رشد، تمایز و القاء تومورزایی استفاده می‌شود. این فناوری‌ها می‌بایست امکان جایگزینی ژن‌های ناقص در رویان در حال نمو را فراهم کنند (ارتباط بالینی ۱۳-۷).



شکل ۳۰-۷ تولید حیوانات ترانس‌ژنیک. در داخل آزمایشگاه، ژن‌های وظیفه‌دار کلون‌شده، ازدیادیافته و خالص‌شده به داخل چندین پیش هسته تخم موش خانگی بارور شده ریزتزریق می‌شوند. این تخم‌ها در داخل مادر قرضی کاشته شدند. DNA از یک قطعه دم هر زاده جدا و با یک پروب جهت شناسایی حیوانات دارای ژن خارجی (موش‌های خانگی ترانس‌ژنیک) پروب می‌شوند. جفت‌گیری بین موش‌های خانگی ترانس‌ژنیک را می‌توان انجام داد تا تولید یک سوش جدید از موش‌های خانگی شود. رده‌های سلولی را نیز می‌توان از بافت‌های مربوط به موش‌های ترانس‌ژنیک جهت مطالعه تنظیم ژن و ساختمان یا عملکرد محصول ژن خارجی به دست آورد.

1. Pronucleus

ارتباط بالینی ۱۲-۷

ژن درمانی: ژن‌های طبیعی را می‌توان به داخل سلول‌هایی ارائه داد که ژن‌های ناقص دارند

A. ژن درمانی برای درمان بیماری نقص ایمنی مرکب شدید (SCID) (OMIM ۱۰۲۷۰۰)

بیش از ۴۰۰۰ بیماری ژنتیکی شناخته شده است که بسیاری از آنها ناتوان‌کننده و یا کشنده هستند. در حال حاضر علاجی برای اکثر اینها وجود ندارد. با پیدایش فناوری‌های جدید در بیولوژی ملکولی، کاربرد بالینی انتقال ژن و ژن درمانی به یک واقعیت تبدیل می‌شود. بیماری‌های حاصل از کمبود آدنوزین دآمیناز (ADA) یا جهشی در ژن کدکننده یک زیرواحد گیرنده‌های سیتوکینی متعدد، γc، دو مورد از میان بیماری‌های ژنتیکی متعددی هستند که ممکن است براحتی با ژن درمانی معالجه شوند.

ADA که تبدیل آدنوزین به اینوزین یا داکسی‌آدنوزین به داکسی‌اینوزین را کاتالیز می‌کند، در بازیافت پورین‌ها مهم است. این آنزیم ۳۶۳ اسید آمینه دارد و بیشترین فعالیت آن در تیموس و سایر بافت‌های لنفوئیدی یافت می‌شود. بیش از ۳۰ جهش در ژن ADA با بیماری نقص ایمنی مرکب شدید (SCID) ارتباط دارند که یک ناهنجاری اتوزومال مغلوب است. این کودکان دچار ضعف ایمنی معمولاً طی چند سال اول زندگی به دنبال عفونت‌های شدید می‌میرند. اولین ژن درمانی در انسان در ۱۴ سپتامبر ۱۹۹۰ با درمان یک دختر ۱۴ ساله مبتلا به ADA آغاز شد. سلول‌های لنفوسیت T خون محیطی این بیمار همراه با فاکتورهای رشد مناسب کشت شدند. ژن ADA در داخل این سلول‌ها به طریق انتقال ژنی به‌واسطه رتروویروس انتقال داده شد. یک رتروویروس تغییریافته طوری ساخته شد که ژن ADA انسانی را داشته باشد و بتواند در سلول‌های انسانی بدون همانندسازی ویروس بیان شود. سپس این سلول‌های T تغییریافته که یک ژن ADA طبیعی را داشتند، دوباره به طریق انتقال خون اتولوگوس به بیمار برگردانده شدند. مقادیر ADA تا ۱۰٪ میزان طبیعی برای طبیعی‌سازی بیمار کافی است. این بیمار بعد از ۱۰ سال در سن ۱۳ سالگی همچنان زنده و خوب بود و سلول‌های T حاوی ژن اصلاح‌شده را در سطح ۲۵-۲۰٪ کل سلول‌های T در گردش خون حفظ کرده بود.

ناهنجاری ارثی وابسته به X، SCID-X1، منجر به توقف تمایز لنفوسیت‌های T و کشنده طبیعی (NK) می‌شود. SCID-X1 حاصل یک جهش در زیر واحد گیرنده سیتوکینی، γc، است که در میان گیرنده‌های اینترلوکین-۲، -۴، -۷، -۹ و -۱۵ مشترک است. روش درمان برای یک بیمار ۸ و ۱۱ ماهه مشابه روشی بود که برای بیماران SCID مبتلا به کمبود ADA انتخاب شده بود؛ شدت این بیماری کمتر از SCID-X1 است. در مطالعات انجام شده بر روی SCID-X1، سلول‌های بنیادی CD34+ با یک ناقل رترو-ویروسی حامل γc cDNA ترانس‌دیوس شدند. این عمل منجر به میزان بالاتر ترانس‌داکشن ژنی در مقایسه با میزان مشاهده شده در مطالعات اولیه شد. هر دو طفل و سیستم ایمنی آنها بعد از ۳ ماه آنقدر طبیعی شدند که دیگر نیازی به جداسازی حفاظتی در بیمارستان نداشتند.

مهلت قانونی ژن درمانی برای SCID-X1 در سال ۲۰۰۳ با القاء یک سندروم لوسمی - مانند در ۲ مورد از ۱۴ کودک اروپایی تحت درمان این بیماری آغاز شد. این لوسمی رتروویروسی در نتیجه الحاق رتروویروسی و تنظیم افزایش ژن LMO2 بوجود آمد که یک فاکتور رونویسی مورد نیاز برای خون‌سازی را کد می‌کند. پیش‌بینی می‌شود که تغییرات آینده در ناقل مورد استفاده برای ژن درمانی می‌بایست مانع الحاق ترجیحی رتروویروس در نزدیکی ژن‌های فعال شود.

B. ژن درمانی برای درمان نابینایی مادرزادی لبر

یک استفاده مهیج ژن درمانی اخیر برای اصلاح عملکرد بینایی در نابینایی مادرزادی لبر می‌باشد که اشکال متعددی از دیستروفی‌های استوانه‌ای-مخروطی شدید ارثی مغلوب با شروع در اطفال را دارد. یک پروتئین 65 kD یک جزء کلیدی چرخه بینایی است که توسط ژن RPE65 در اپی‌تلیوم رنگدانه شبکیه کد می‌شود. یک ژن غیروظیفه‌دار RPE65 منجر به از دست رفتن ۱۱- سیس رتینال می‌شود که برای پاسخ سلول‌های گیرنده فوتون قرمز به نور لازم است. به‌نظر می‌رسد که کودکان یک مسیر جایگزین برای دسترسی به ۱۱- سیس رتینال دارند که با افزایش سن ناپدید می‌شود. عملکرد بینایی کودکان مبتلا به این بیماری با افزایش سن و دژنراسیون پیشرونده سلول‌های گیرنده فوتونی مخروطی، کاهش می‌یابد. سه بیمار (۲۳-۱۷ سال) یک ناقل ویروسی نوترکیب مرتبط با آدنوویروس حاوی توالی کدکننده RPE65 انسانی داشتند که به‌طریق جراحی به فضای زیرشبکیه یک چشم تجویز شده بود. در زمان جراحی، هر کدام از این بیماران در نور خوب قدری عملکرد بینایی را داشتند ولی در نور پایین این میزان محدود بود و یا وجود نداشت. نتایج این مطالعه نشان داد که بیماران مبتلا به دژنراسیون پیشرفته سلول‌های گیرنده فوتونی مخروطی با ژن درمانی RPE65 بهبود نسبتاً کمی را در عملکرد بینایی به‌دست آوردند. تصور می‌رود در صورتی که این نوع ژن درمانی‌ها به بیمارانی با سن پایین‌تر داده شوند، نسبت به بالغین، فایده بیشتری خواهند داشت.

ارتباط بالینی ۱۳-۷

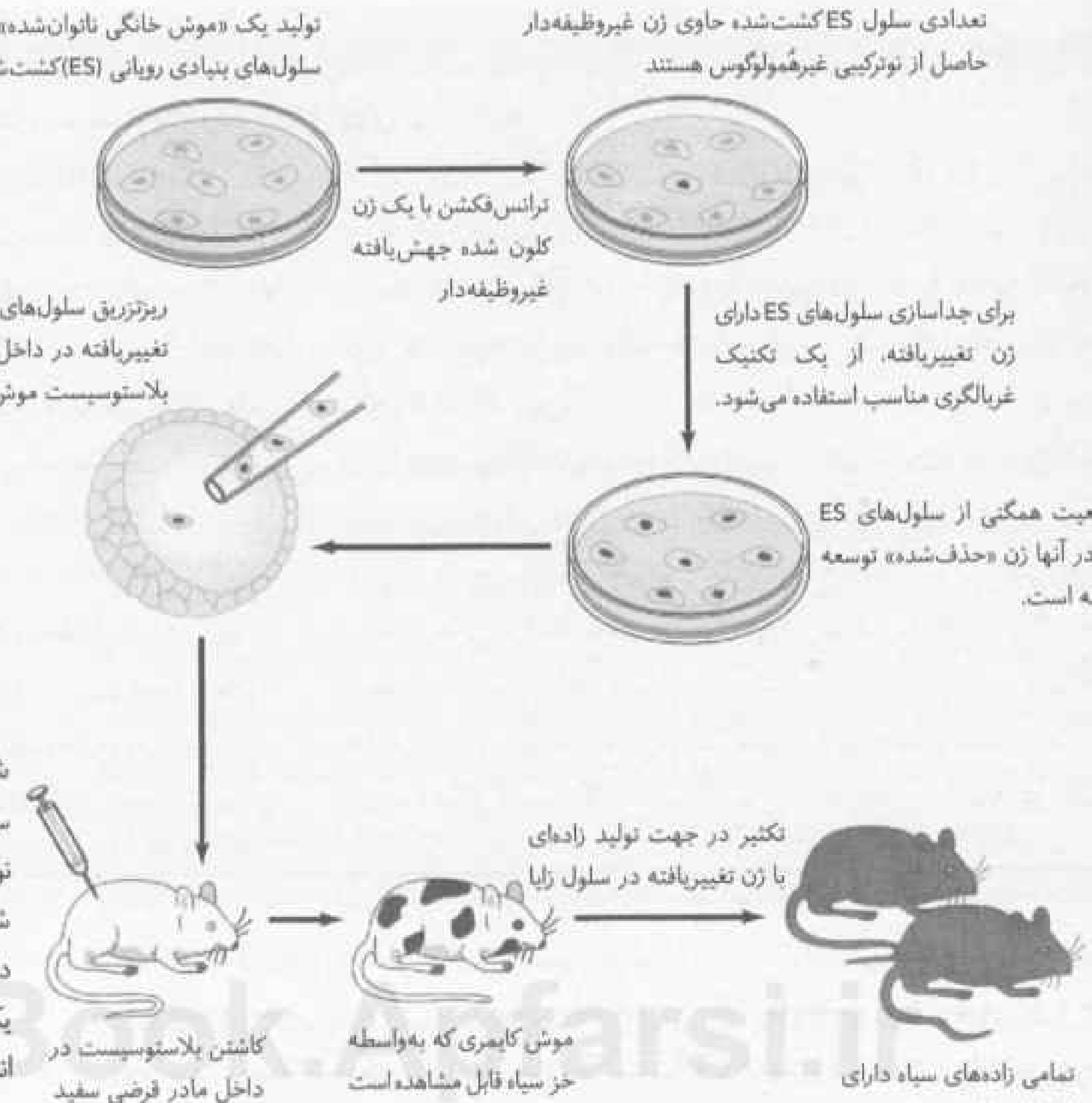
مدل‌های حیوانی ترانس‌ژنیک

مدل‌های حیوانی ترانس‌ژنیک امید اصلاح بیماری‌های ژنتیکی را در ابتدای نمو جنینی فراهم نموده‌اند. از این مدل‌ها برای مطالعه تنظیم بیان و عملکرد محصولات ژنی اختصاصی در یک حیوان استفاده شده است و ممکن است منجر به خلق نسل‌های جدید حیواناتی شوند که ارزش تجاری دارند. با ریزتزریق ژن‌های هورمون رشد موش صحرایی به داخل پیش‌هسته‌های نر (ص.۴۰۰)، موش‌های خانگی ترانس‌ژنیکی از تخم‌های بارورشده موش خانگی تولید شده‌اند. به داخل هر تخم حدود ۶۰۰ نسخه از این ژن، ادغام‌شده در ناحیه پروموتری متالوتیونئین-I (MT-I) موش خانگی، ارائه شد؛ سپس این تخم‌ها در داخل مجرای تناسلی موش صحرایی مادر قرضی قرار داه شدند. موش‌های ترانس‌ژنیک حامل ژن GH در داخل ژنوم خود بودند. در روز ۳۳ بعد از تولد، به رژیم غذایی این حیوانات ZnSO4اضافه شد تا پروموتر MT-I فعال و رونویسی ژن GH موش صحرایی آغاز گردد. بیان بیش از حد پیوسته GH موش صحرایی در برخی حیوانات ترانس ژنیک همراه با تولید موش‌های خانگی با اندازه تقریباً دو برابر نسبت به موش‌هایی بود که فاقد ژن GH موش صحرایی بودند. یک موش ترانس ژنیک، این ژن GH موش صحرایی را به نیمی از اولادهای خود انتقال داد که نشان می‌دهد این موش به شکل پایداری آن را در داخل ژنوم سلول زایای خود قرار داده بود و امکان تولید نسل‌های جدید این حیوانات وجود دارد.

موش‌های خانگی ناتوان‌شده

خلق حیوانی با یک ژن تخریب‌شده انتخابی در هر سلول به محققین این امکان را می‌دهد که نقش بیولوژیکی آن ژن را در صورتی تعیین کنند که از دست رفتن آن کشنده نباشد. اصول پایه خلق یک **موش خانگی پوچ یا ناتوان**[1] مستلزم غیرفعال‌سازی یک ژن نوترکیب خالص‌شده، ارائه این ژن تغییریافته به داخل یک سلول بنیادی رویانی[2] (ES) طوری که جایگزین ژن طبیعی شود، تزریق ES به داخل بلاستوسیست، کاشتن این بلاستوسیست در یک مادر پرونده[3] و انتخاب اولاد فاقد ژن طبیعی می‌باشد. یک رهیافت معمول در جهت غیرفعال‌سازی یک ژن انتخاب‌شده، قراردادن یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک، تحت عنوان نئو[4]، در داخل ژن کلون‌شده مورد نظر می‌باشد. با این عمل هم ژن مورد نظر غیرفعال می‌شود و هم امکان شناسایی سلول‌های ESای فراهم می‌گردد که به شکل موفقیت‌آمیزی ترانسفکت شده‌اند. ژن طبیعی موجود در درصد بسیار کمی از سلول‌های ES ممکن است به‌واسطه **نوترکیبی هُمولوگوس** توسط ژن نوترکیب نئو-قطع‌شده[5] جایگزین شود. توالی‌های نوکلئوتیدی ژن تغییریافته یا قطع‌شده با توالی هُمولوگوس ژن طبیعی در یک صف قرار گرفته و با آن جابه‌جا می‌شود، یا ممکن است در داخل ژن طبیعی قرار گیرد. در هر حالت، نتیجه خالص تخریب یا ناتوان‌سازی ژن سلولی ES می‌باشد. انتخاب سلول‌های ES تغییر یافته، ریزتزریق به داخل بلاستوسیست موش خانگی، تولد اولاد کایمری و پرورش اولاد هُموزیگوس از نظر ژن تغییریافته (شکل ۳۱-۷)، یک فرایند فوق‌العاده پرزحمت می‌باشد. این فرایند در تجارب متعددی برای ارزیابی نقش ژن‌های انتخاب‌شده مورد استفاده قرار گرفته است (ارتباط بالینی ۱۴-۷).

1. Null or knockout mouse 2. Embryonic stem 3. Foster mother 4. Neo 5. Neo-disrupted recombinant gene



شکل ۳۱-۷ تولید یک موش خانگی ناتوان‌شده. سلول‌های رویانی کشت‌شده را می‌توان از طریق فناوری نوترکیب دستکاری نمود تا حامل یک ژن ناقص یا «حذف شده» شود. این سلول‌های تغییریافته را می‌توان به داخل یک بلاستوسیست ارائه داد که بعداً در داخل یک مادر فرضی کاشته می‌شود. سپس زاده‌ای را می‌توان انتخاب نمود که که دارای ژن «حذف‌شده» غیروظیفه‌دار در تمامی سلول‌های خود است - حیوان ناتوان‌شده.

دالی، بره کلون‌شده از یک سلول بالغ

کلون‌سازی حیوانات سؤالات اخلاقی متعددی را به همراه دارد: آیا انتخاب ترکیب ژنتیکی حیوانات و تکثیر این حیوانات، در حدود کاری انسان است؟ واضحاً، مزایای تجربی متعدد زیادی برای تولید حیواناتی با اطلاعات ژنتیکی یکسان وجود دارد. هرچند، کاربرد تکنیک‌های کلون‌سازی حیوان کامل در انسان، مسائل اخلاقی را به همراه دارد که اکثر آنها غیرقابل قبول هستند.

کلون‌سازی اولاد قابل زیست از سلول‌های پستانداران بالغ، کار بسیار پرزحمتی است. روش تولید دالی[1]، بره کلون‌شده، با کشت سلول‌های غدد پستانی از یک میش Finn Dorset شش ساله شروع شد. سلول‌ها با نگهداری در محیط کشت حاوی میزان کم سرم، در G_0 متوقف شدند. سپس هسته‌های مربوط به سلول‌های دهنده دیپلوئید ساکن به اووسیت‌های بی‌هسته‌شده گرفته‌شده از یک میش صورت‌سفید اسکاتلندی[2] انتقال داده شدند. تخمی که به‌طریق مصنوعی بارور شده بود، در داخل محیط کشت تا مورولا یا بلاستوسیست

1. Dolly 2. Scottish Blackface ewe

ارتباط بالینی ۱۴-۷

موش‌های خانگی ناتوان‌شده برای تعریف نقش گیرنده‌های پورینی $P2Y_1$

پلاکت‌ها نقش محوری در هموستاز و ترومبوز دارند. ADP یک آگونیست فیزیولوژیک مهم القاءکننده تجمع پلاکتی است. مطالعات انجام‌شده در دهه ۱۹۷۰ این عقیده را مطرح نمودند که ADP اتصال‌یافته به گیرنده جفت‌شده با پروتئین G، سبب القاء تجمع پلاکتی می‌شود، در حالی‌که ATP خارج‌سلولی با اثر بر روی همان جایگاه گیرنده، به‌طور رقابتی مانع تجمع پلاکتی می‌شود. گاهی قواعدی که متکی بر شواهد محدود هستند، در داخل حفاظ‌های محکمی قرار می‌گیرند و کار مجدد بر روی آنها سال‌ها طول می‌کشد. در دهه ۱۹۹۰ مشخص شد که پلاکت‌ها حداقل سه گیرنده پورینی با ویژگی‌های اتصالی متفاوت برای ATP در مقابل ADP دارند. از نظر بالینی، شناخت نحوه عملکرد این گیرنده‌های دارای پتانسیل تعامل، بسیار مهم است. ATP و ADP تحت شرایط مختلف طبیعی و پاتولوژیکی به‌داخل سیستم قلبی – عروقی /خون آزاد می‌شوند. تعادل بین عمل آگونیستی ADP و آنتاگونیستی ATP ممکن است نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های پلاکتی داشته باشد. تعریف مکانیسم‌های عمل ممکن است منجر به تولید داروهای جدیدی برای مقابله با ترومبوز شود. اخیراً با تولید یک مدل موش صحرایی ناتوان‌شده (پوچ)، امکان ارزیابی نقش گیرنده پورینی $P2Y_1$ فراهم شد.

با وجود این که گیرنده P2Y1 در بسیاری از بافت‌ها، غیر از پلاکت‌ها یافت می‌شود، این موش‌های ناتوان‌شده هیچ ناهنجاری واضحی را نشان ندادند. هر چند، مقادیر طبیعی ADP قادر به القاء تجمع پلاکتی در آنها نبود، در حالی‌که غلظت‌های بالای ADP این توانایی را داشت. پلاکت‌های تجمع‌یافته تغییر شکل معمول را در شکل نشان ندادند. این موش‌های خانگی $P2Y_1$ –پوچ در مقابل ترومبو آمبولی مقاوم بودند، و به‌همین دلیل این گیرنده ممکن است یک هدف خوب برای داروهای ضدترومبوز باشد.

نمو یافت و سپس به‌داخل یک میش پذیرنده ارائه شد که جنین را تا انتهای دوره حمل نمود. تنها درصد کوچکی از رویان‌های کاشته‌شده تا انتهای دوره زنده ماندند. هرچند، روش کلون‌سازی اولاد از سلول‌های پیکری بالغین به‌شکل موفقیت‌آمیزی به گاو، موش خانگی و میمون توسعه یافته است. دالی به‌دلیل یک بیماری پیشرونده ریوی مرتبط با چیزی که به‌نظر می‌رسید یک فرایند افزایش سن نارس[1] می‌باشد، در سال ۲۰۰۴ مُرد. مشخص نیست که این نقص‌ها نتیجه یک فرایند کلون‌سازی و یا عوامل محیطی هستند. هر چند، کاوش در خصوص تکنیک‌های کلون‌سازی با قصد این که کلون‌سازی ارزش درمانی زیادی خواهد داشت، ادامه دارد. اخیراً یک موش خانگی ماده از دو تخم ماده، از طریق بای‌پس فرایندی تحت عنوان **اثرگذاری**[2] خلق شد. اثرگذاری نشان می‌دهد که برخی ژن‌های فعال می‌بایست توسط مادر و تعدادی توسط پدر فراهم گردند. به‌طور طبیعی رویان‌هایی از پستانداران که با دو مجموعه کروموزومی ماده یا نر مهندسی شده‌اند، نمو نخواهند داشت. موش خانگی ماده‌ای که از دو مادر خلق شده بود، تا بزرگسالی زنده ماند و بچه‌های خود را به دنیا آورد.

با موفقیت در خلق دالی و جداسازی **سلول‌های بنیادی رویانی انسان**[3] **(hESC)**، دانشمندان تحقیق خود در جهت ترکیب این دو تکنیک در جهت خلق سلول‌های بنیادی رویانی را آغاز نموده‌اند که از نظر ژنتیکی برای یک بیمار خاص طراحی شده‌اند **(کلون‌سازی**

1. Premature aging process 2. Imprinting 3. Human embryonic stem cells

درمانی[1]). یکی از مراحل اصلی در این جهت توسط تلاش هرکولی[2] به انجام رسید که یک رده hESC مشتق از یک بلاستولای کلون‌شده را خلق کرد. این بلاستولای کلون‌شده با قراردادن هسته یک سلول کومولوس انسانی[3] (سلول‌های احاطه‌کننده یک تخم در یک تخمدان) در داخل یک تخمک انسانی فاقد هسته و قراردادن آن در یک محیط شیمیایی مناسب برای القاء همانندسازی، خلق شد. رده hESC به‌طور طبیعی در کشت رشد می‌کند و می‌بایست قادر به تمایز به تمامی انواع سلول‌های بدن باشد. این سلول‌ها می‌توانند به سلول‌های طبیعی هر نوع بافتی القاء شوند تا جایگزین بافت‌های معیوب در بیماران گردند.

سلول‌های بنیادی رویانی **سلول‌های چنداستعدادی**[4] هستند که می‌توانند در حضور محیط و ملکول‌های پیام‌رسان مناسب، به هر نوع سلول در داخل یک موجود زنده نمو یابند. موضوعات امیدوارکننده و اخلاقی زیادی پیرامون نمو و استفاده از سلول‌های بنیادی رویانی برای درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی وجود دارد. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که سلول‌های پیکری انسانی را می‌توان دوباره به سلول‌های بنیادی چنداستعدادی رویان‌مانند برنامه‌ریزی نمود. ارائه پایدار چهار فاکتور رونویسی Oct4، Sox2، Klf4 و Myc به داخل سلول‌های پیکری انسان توسط ناقلین ویروسی منجر به تولید **سلول‌های بنیادی القاءشده-چنداستعدادی**[5] **(iPS)** شد. با وجود این که کارهای زیادی برای نشان‌دادن ایمنی استفاده از این سلول‌های iPS برای درمان بالینی بیماری‌ها وجود دارد، پتانسیل آنها متعدد است. به‌علاوه، سلول‌های iPS می‌توانند برای اجتناب از هر نوع پاسخ ایمنی، اختصاصی بیمار باشند.

DNA نوترکیب در کشاورزی تأثیر تجارتی دارد

شاید بزرگترین سود بشریت استفاده عملی از فناوری نوترکیب جهت بهبود محصولات کشاورزی است. ژن‌هایی می‌بایست شناسایی و جدا شوند که سبب رشد بیشتر محصولات، رشد سریع گیاه، مقاومت به شرایط نامناسب نظیر دوره‌های خشکسالی و سرما، و اندازه گیاه می‌گردند. ژن‌های جدیدی که برای گیاهان معمول نیستند ممکن است مهندسی شده تا سبب مقاومت گیاهان نسبت به حشرات، قارچ‌ها یا باکتری‌ها شوند. بالاخره، ژن‌های مربوط به پروتئین‌های ساختمانی می‌توانند طوری تغییر داده شوند که حاوی اسیدهای آمینه ضروری باشند که به‌طورطبیعی وجود ندارند و این تغییر سبب تغییر در فعالیت پروتئین نشود. تولید گیاهان دارای خصوصیات ژنتیکی جدید نیاز به ارائه ژن‌ها به داخل سلول‌های گیاهی دارد که می‌توانند به گیاهان کامل تمایز یابند.

اطلاعات ژنتیکی جدید موجود در پلاسمیدهای زخم تاجی[6] را می‌توان به داخل گیاهانی انتقال داد که توسط باکتری‌های خاک، تحت عنوان آگروباکتر، عفونی شده‌اند. آگروباکتری‌ها به‌طور طبیعی حاوی یک پلاسمید زخم تاجی یا Ti (القاءکننده تومور[7])

---

1. Therapeutic cloning
2. Herculean effort
3. Human cumulus cell
4. Pluripotential cells
5. Induced-pluripotent stem
6. Crown gall
7. Tumor-inducing

هستند که ژن‌های آن در داخل یک کروموزوم سلول عفونت‌یافته قرار داده می‌شود. ژن‌های پلاسمیدی سلول گیاهی میزبان را در جهت تولید اسید آمینه‌های جدیدی، به‌نام عنوان اوپین‌ها[1] (نظیر مشتقات اسید آمینه‌ای آرژینین و پیرووات، اوکتوپین[2]، یا آرژینین و α - کتوگلوتارات، نوپالین[3]) هدایت می‌کند که برای رشد باکتریایی مورد نیاز است. یک زخم تاجی، یا توده توموری، متشکل از سلول‌های گیاهی تمایزنیافته، در محل عفونت باکتریایی تولید می‌شود. به دنبال عفونت با آگروباکتری‌ها، ژن‌های جدید مهندسی‌شده موجود در پلاسمید T_i می‌توانند به داخل سلول‌های گیاهی ارائه شوند. آنگاه این سلول‌ها می‌توانند در کشت رشد کرده و در جهت تمایز مجدد به گیاهان کامل القاء شوند. هر سلول اطلاعات ژنتیکی جدیدی خواهد داشت و یک گیاه ترانس‌ژنیک خواهد بود.

قبل از اینکه پیشرفت‌های قابل توجه در منابع غذایی جهانی قابل درک باشند، لازم است بر برخی محدودیت‌ها در تولید گیاهانی با خصوصیات ژنتیکی بهبودیافته غلبه شود. به‌طور واضح، ژن‌های مربوط به خصوصیات مورد نظر را می‌بایست تعیین‌هویت و جداسازی نمود. همچنین محصولات مهمی نظیر ذرت و گندم را نمی‌توان با پلاسمیدهای T_i ترانسفورمه نمود؛ لذا لازم است ناقلین دیگری مورد شناسایی قرار گیرند. موفقیت قابل توجهی در طراحی محصولات گیاهی مقاوم به حشرات و ویروس‌ها حاصل شده است. اخیراً با استفاده از مهندسی ژنتیک، یک ژن خارجی در داخل گیاهان نخود برای تولید پروتئینی قرار داده شده است که مانع تغذیه لاروهای شپش[4] بر روی دانه‌های نخود می‌شود. این امکان ذخیره‌سازی نخودها و سبزیجات دیگر بدون نیاز به عوامل شیمیایی محافظ ضدعفونی‌کننده را فراهم می‌سازد (در حال حاضر کشاورزان برزیل ۲۰٪ تا ۴۰٪ لوبیاهای خود را به دلیل آفت از دست می‌دهند).

۷-۱۱ • ژنومیک، پروتئومیک و آنالیز ریزآرایه

ژنومیک مطالعه خصوصیات ملکولی کل ژنوم است. این شامل بررسی توالی ژنوم، تعیین هویت ژن‌ها و توالی‌های تنظیمی آنها و الگوی بیان ژن می‌باشد. ده‌ها ژنوم پروکاریوتی و اوکاریوتی و بیش از یک صد ویروس، تعیین توالی شده‌اند (جدول ۱-۷). تعیین توالی ژنوم‌های متعدد مربوط به میکروب‌های دریایی تقریباً یک میلیون ژن جدید را به ۱۸۰ ۰۰۰ ژن تصدیق‌شده اضافه کرده است. برآورد شده است که بیش از ۱۰ میلیارد ژن جدید در فهرست زمین وجود دارد. یک ژن واحد ممکن است به دلیل نحوه اسپلایس رونوشت **RNA** و پردازش بعد از ترجمه متفاوت محصول پروتئینی، انواع متعددی از پروتئین‌ها را تولید کند. مجموعه کامل پروتئین‌های موجود در داخل یک سلول را **پروتئوم** آن سلول گویند. پروتئومیک مطالعه پروتئین‌های بیان‌شده در شرایط مختلف در بافت‌ها، تعاملات پروتئینی و تغییرات پروتئینی است. ارتباط بالینی ۱۵-۷ تشریح می‌کند که چگونه پروتئومیک با

1. Opines 2. Octopine 3. Nopaline 4. Weevil larvae

جدول ۱-۷ • فهرست نسبی گونه‌های پروکاریوتی و اوکاریوتی که ژنوم آنها تعیین توالی شده است

	گونه	اندازه ژنوم
پروکاریوت‌ها (بیش از ۱۰۰ میکروب)	*Hemophilus influenzae*	۱٫۸۳ Mb
	Chlamydia pneumoniae	۱٫۲۳ Mb
	Neisseria meningitides	۲٫۲۷ Mb
	Vibrio cholerae	۴٫۰ Mb
		تعداد کروموزوم‌ها
اوکاریوت‌های ساده	*Saccharomyces cerevisiae* (مخمر)	۱۶
	Plasmodium falciparum (تک‌یاخته مالاریا)	۱۴
	Anopheles gambiae (پشه)	۳
	Drosophila melanogaster (مگس میوه)	۵
گیاهان	*Avena sativa* (جودوسر)	۷
	Hordeum vulgare (جو)	۷
	Oryza sativa (برنج)	۱۲
	Zea mays (ذرت)	۱۰
مهره‌داران	*Danio rerio* (گورخر ماهی)	۲۵
	Gallus gallus (مرغ)	۳۹
	Mus musulus (موش خانگی)	۲۱
	Rattus norvegicus (موش صحرایی)	۲۲
	Homo sapiens (انسان)	۲۴

شناسایی بیومارکرهای مرتبط با تومور، برای تشخیص مراحل زودرس سرطان مورد استفاده قرار گرفته است.

آنالیز ریزآرایه

با ابداع فناوری‌های ریزآرایه[1] که در ابتدا برای آنالیز اسیدهای نوکلئیک ابداع شدند، آنالیز ژنوم و پروتئوم به میزان زیادی تسهیل شده است. هیبریدیزاسیون اسید نوکلئیک و تولید کمپلکس آنتی‌بادی - آنتی‌بادی کاربرد گسترده‌ای در تکنیک‌هایی دارند که در قسمت‌های قبلی برای آنالیز یک یا چند ماکروملکول شرح داده شدند. هر چند، برای آنالیز همزمان صدها تا هزاران ژنی که در یک سلول بیان می‌شوند نیاز به تکنیک‌هایی با راندمان بسیار بالا می‌باشد. تکنیک‌های ریزآرایه متکی بر همان تعاملات ماکروملکولی هستند که قبلاً در لکه‌گذاری‌های ساترن، نورترن و وسترن شرح داده شدند. ثابت‌نمودن پروب‌های DNA بر روی سطوح جامد غیرقابل نفوذ سبب کاهش حجم محلول و زمان مورد نیاز برای

1. Microarray

ارتباط بالینی ۱۵-۷

تکنیک‌های ریزآرایه برای جستجو و درمان بیماری‌ها

الف. آنالیز ریزآرایه اسید نوکلئیک برای سرطان پستان

نحوه درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان، به میزان زیادی، بستگی به وضعیت گیرنده استروژن (ER) در سلول‌های توموری دارد. تومورهای گیرنده استروژن - مثبت عموماً پاسخ خوبی به هورمون یاور یا درمان دارویی می‌دهند، در حالی که تومورهای ER- منفی معمولاً این‌طور نیستند. بیماران مبتلا به تومورهای ER- منفی، پاسخ‌های متفاوتی را به شیمی‌درمانی نشان می‌دهند و هیچ نشانگر شناخته‌شده‌ای برای پیش‌بینی پیش‌آگهی بعد از جراحی آنها وجود ندارد. RNA سلولی ازدیادیافته از ۱۰ بیمار ER- منفی که ظرف ۵ سال به دلیل سرطان پستان فوت نموده بودند و ۱۰ بیمار ER- منفی که زنده و فاقد بیماری بودند، بر روی یک ریزآرایه متشکل ۲۵۳۴۴ ژن آنالیز شد. در این آنالیز، ۷۱ ژن یافت شد که در گروه بیمارانی که فوت کرده بودن در مقایسه با بیماران زنده بیان بیشتری داشتند و به همین ترتیب ۱۵ ژن یافت شد که بیان آنها در زنده‌مانده‌ها بیش از فوت‌شده‌ها بود. یک سیستم امتیازبندی براساس مارکرهای ژنی برای طبقه‌بندی بیماران مبتلا به سرطان پستان ER- منفی به یک گروه با پیش‌آگهی ضعیف در برابر یک گروه با پیش‌آگهی خوب ابداع شد. به‌نظر می‌رسد که این سیستم امتیازبندی، صحت بالایی دارد و ممکن است به پروتوکل‌های درمانی مستقیم کمک نموده و اهداف ژنی جدیدی را برای درمان دارویی مشخص کند.

ب. فناوری ریزآرایه آنتی‌بادی برای درمان تومورهای مغزی

گلیوبلاستوم مولتی‌فورم[1] (GBM) شایع‌ترین تومور سیستم عصبی مرکزی در بالغین انسانی است و متأسفانه یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها می‌باشد. فعال‌سازی غیرطبیعی اجزاء مسیر فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳-کیناز (PI3K) یک مشخصه برجسته GBM، و همچنین سرطان‌های دیگر، است. تیروزین کینازهای گیرنده‌ای (RTKs) سبب فعال‌سازی PI3K می‌شوند. برخی از RTKها شامل گیرنده‌های فاکتور رشد EGFR، PDGFR، و VEGFR می‌باشند. با آنالیز عصاره‌های سلول توموری مجاورشده با آرایه‌های آنتی‌بادی RTK، وجود PI3K فعال‌شده توسط RTKهای متعدد نشان داده شد. در اینجا آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای RTKهای مختلف بر روی یک محیط پشتیبان جامد ثابت می‌شوند و به RTKهای سلولی اتصال می‌یابند. RTK فعال‌شده موجود در عصاره سلولی در محل ریشه‌های تیروزینی فسفریله می‌شوند که به راحتی در کمپلکس RTK- آنتی‌بادی توسط آنتی‌بادی ثانویه متصل به پراکسیداز ترب‌کوهی (HRP) ضد فسفو- تیروزین‌ها جستجو می‌شوند. سپس از یک سوبسترا (فلورسنت یا رنگی) برای شناسایی نوع RTK فعال موجود در یک عصاره سلول توموری استفاده شد. با شناسایی نوع RTKهای درگیر در فعال‌سازی PI3K در یک رده سلول توموری خاص، مهارکننده‌های RTK اختصاصی از نظر توانایی خود در کاهش تولید کلونی و زیست‌پذیری سلول مورد آزمایش قرار گرفتند. استفاده از فقط یک مهارکننده RTK، تأثیر کمی داشت و مهارکننده‌های دوتایی RTK مؤثرتر بودند. هرچند، استفاده از سه مهارکننده RTK بیشترین اثر را داشت. تومورهای GBM انسانی اولیه درمان‌نشده همگی RTKهای فسفریله متعددی را داشتند، در حالی که بافت مربوط به نمونه‌های طبیعی مغز فاقد فعال‌سازی RTK قابل جستجو بودند. این مطالعات توانایی تعیین سریع مجموعه RTKهای فعال‌شده در نمونه‌های GBM مربوط به بیماران را نشان دادند، به‌طوری که پزشکان می‌توانند براساس آنها درمان دارویی خود را فردی کنند.

1. Glioblastoma multiforme

هیبریدیزاسیون می‌شود. ریزآرایه‌های DNA با افزودن تحت کنترل کامپیوتری ریزقطره‌هایی از توالی‌های DNA کلون‌شده یا حاصل از سنتز به طریق PCR، به یک اسلاید شیشه‌ای با یک سوبسترای پلی-L- لیزین که به آن این پروب‌های DNA با ایجاد اتصالات عرضی کووالان اتصال یافته‌اند، تولید می‌گردند. DNA یا RNAای که قرار است آنالیز شود، با ایزوتوپ یا فلورسنت نشاندار شده و سپس با پروب‌های ثابت‌شده بر روی یک اسلاید شیشه‌ای هیبرید می‌شود (شکل ۳۲-۷). واکنش‌های مثبت با تصویربرداری با وضوح بالا و آنالیز کامپیوتری، تعیین مقدار می‌شوند. ریزآرایه‌های DNA متعددی در دسترس قرار دارند که بر

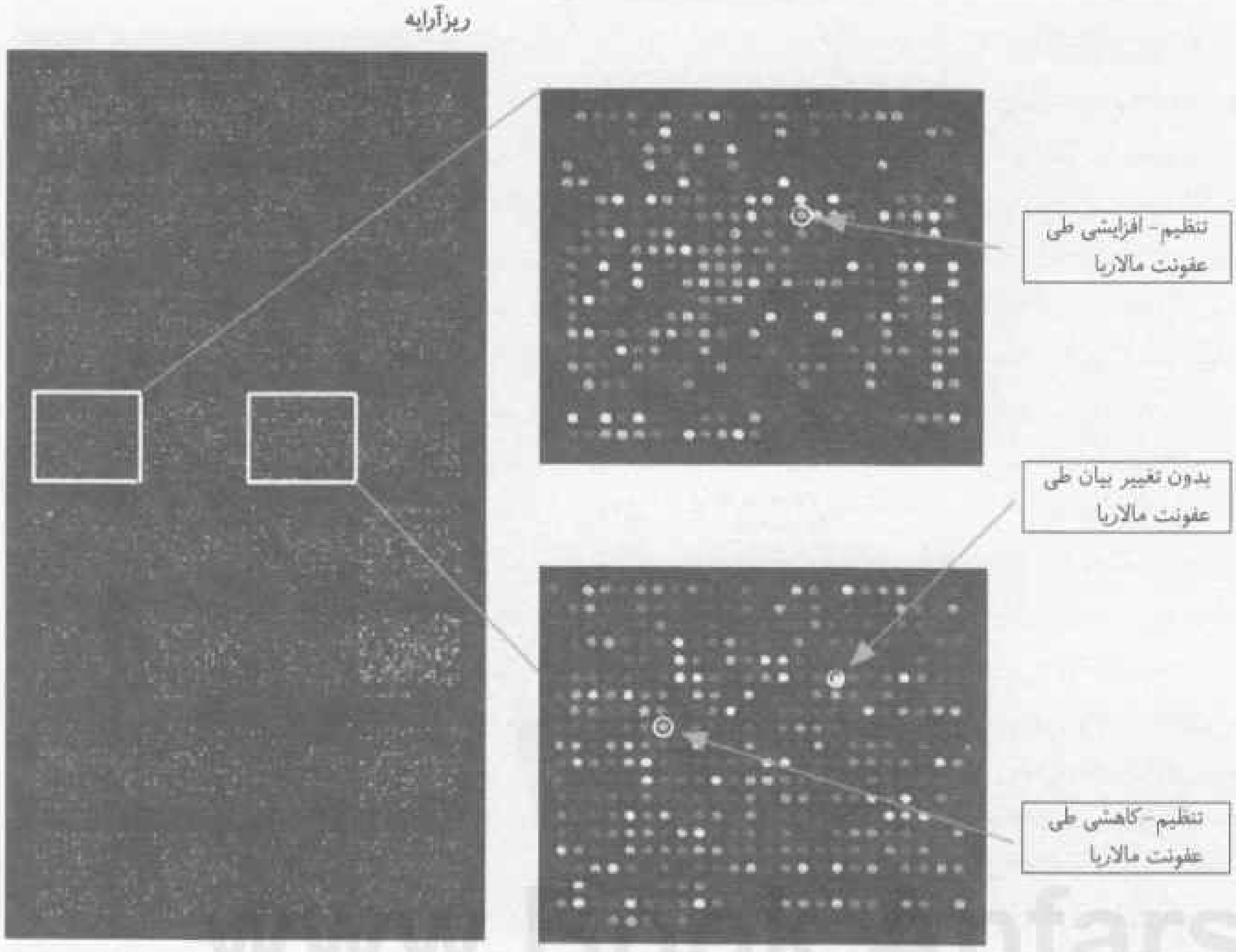


شکل ۷-۳۲ **آنالیز ریزآرایه DNA.** از سطح یک محیط پشتیبان غیرقابل‌نفوذ، معمولاً شیشه یا پلی‌پروپیلن، برای قراردادن نمونه‌های متعدد DNA یا اولیگونوکلئوتیدها، استفاده می‌شود. اسلاید دارای صدها تا هزاران ژن، تحت شرایط مناسب برای هیبریدیزاسیون، در داخل یک اتاقک قرار داده می‌شود و سپس شستشوی مناسب برای برداشت cDNA هیبریدنشده صورت می‌پذیرد. نقاط فلورسنت سبز نشانه‌ای از ژن‌های بیان‌شونده در سلول‌های کبد، نقاط فلورسنت قرمز برای ژن‌های بیان‌شونده در سلول‌های ریه، و نقاط فلورسنت زرد برای ژن‌های بیان‌شونده در هر دو بافت می‌باشند.

روی ژن‌های انتخاب‌شده درگیر در فرایندها یا مسیرهایی نظیر هدایت پیام یا آپوپتوز متمرکز می‌باشند. یک مثال اختصاصی بیان تغییریافته ژن در سلول‌های عفونت‌یافته با مالاریا در شکل ۳۳-۷ شرح داده شده است.

اولیگونوکلئوتیدهای DNA (معمولاً با ۲۰ یا تعداد بیشتری باز) نیز بر روی ریز-زمینه‌های[1] ثابت‌شده بر روی یک اسلاید شیشه‌ای سنتز می‌شوند. اندازه این ریززمینه از $5\,\mu m \times 10 \times 1$ تا $20\,\mu m \times 100 \times 100$ متفاوت می‌باشد. هزاران اولیگونوکلئوتید متفاوت، هر کدام مکمل یک ژن اختصاصی، بر روی چیزی ثابت می‌شود که یک خرده DNA[2] نامیده می‌شود. یک ریزآرایه تک-خرده[3] برای ژنوم انسان که ممکن است به صورت تجارتی در دسترس قرار داشته باشد، حاوی یک میلیون پروب اولیگونوکلئوتیدی می‌باشد. این خرده DNA حدود ۵۰,۰۰۰ رونوشت RNA را از حدود ۳۰,۰۰۰ ژن انسانی مورد

1. Micromatrices 2. DNA chip 3. Single-chip microarray



شکل ۳۳-۷ آنالیز ریزآرایه بیان ژن در موش‌های خانگی مبتلا به عفونت با یک انگل مالاریای جوندگان. DNA، RNA یا اولیگونوکلئوتیدها به عنوان بخشی یا تمامی ژنوم سلولی، یا پروتئین‌ها یا آنتی‌بادی‌ها، به عنوان بخشی از پروتئوم سلولی، بر روی یک محیط پشتیبان غیرقابل‌نفوذ ثابت می‌شوند. این پروب‌های ثابت‌شده با اجزاء سلولی که به شکل مناسبی نشاندار شده‌اند، از طریق هیبریدیزاسیون یا تعاملات پروتئین- پروتئین ایجاد یک کمپلکس پایدار می‌کنند. شناسایی اسیدهای نوکلئیک یا پروتئین‌هایی که به نمونه‌های ثابت‌شده در ریزآرایه‌ها می‌پیوندند، امکان آنالیز بیان ژنی سلول را در سلول‌های حفظ‌شده در شرایط مختلف فراهم می‌سازد.
ریزآرایه‌های DNA موش خانگی از ژنوم موش خانگی تولید شدند که حاوی ۱۳ ۴۴۳ اولیگونوکلئوتید سنتتیک به عنوان نماینده‌ای از ژن‌های به‌خوبی- مشخص‌شده موش خانگی می‌باشد. طول هر اولیگو- نوکلئوتید ۷۰ باز است و از انتهای '۳ هر ژن به‌دست آمده است که برای حداقل‌سازی هیبریدیزاسیون- متقاطع با تمامی ژن‌های شناخته‌شده موش خانگی مطلوب‌سازی شده است. این آرایه یک مجموعه کامل از ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی کدکننده یک زیرمجموعه لنفوسیتی و مارکرهای فعال‌سازی، سیتوکین‌ها، کموکین‌ها، گیرنده‌های مربوطه، ملکول‌های چسبان، ملکول‌های هم‌تحریکی، فاکتورهای تنظیمی- ایمنی، فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های ترانس‌داکشن پیام، و موارد دیگر می‌باشد. نمونه‌ها: از RNA سلول طحال موش‌های خانگی عفونت‌نیافته برای سنتز cDNA نشاندار با فلورسنت Cy3 (سبز) استفاده شد. از RNA سلول طحالی موش خانگی در روز هشتم عفونت با یک انگل مالاریای جوندگان برای سنتز cDNA نشاندار با فلورسنت Cy5 (قرمز) استفاده شد. این پروب‌های cDNA مخلوط نشاندار با فلورسنت، با آرایه اولیگو- نوکلئوتیدی هدف هیبرید می‌شوند. ژن‌هایی که در موش‌های خانگی مبتلا به عفونت مالاریا تنظیم-افزایش دارند، قرمز هستند و آنهایی‌که در این حیوانات تنظیم- کاهشی دارند، سبز می‌باشند.
ژن‌هایی که تحت تأثیر انگل مالاریا قرار نمی‌گیرند، زرد می‌باشند.

جستجو قرار خواهد داد. این ریزخرده‌های[1] بیولوژیکی با ریزخرده‌های الکترونیکی مقایسه می‌شوند، زیرا هر دو قادر به انجام واکنش‌های متعدد به‌طریق موازی و با راندمان بالا می‌باشند.

ریزآرایه‌ها امکان آنالیز بیان کل ژنوم یا ژن‌ها را در یک مسیر انتخابی فراهم می‌سازند. ژن‌هایی که در یک بافت اختصاصی یا شرایط خاص متابولیکی یا بیماری بیان می‌شوند، می‌توانند نشان دهند که چه ژن‌هایی در شرایط اختصاصی فعال هستند. متأسفانه، یک ریزآرایه واحد یک تصویر فوری و ساکن از بیان ژن‌های ژنومی در یک حالت خاص می‌باشد. ژن‌های تنظیمی درگیر در بیان تغییریافته نهایی را نمی‌توان به‌راحتی از این تصویر استنتاج نمود، زیرا ژن‌های متعددی ممکن است توسط مسیرهای فرودست طی تغییر به حالت سلولی نهایی روشن و خاموش شوند. ژن‌های هم‌تنظیمی درگیر در سوییچ بین حالات متابولیکی یا بیماری مختلف را می‌توان با آنالیز ریزآرایه در نقاط زمانی متعدد بین مراحل ابتدایی و انتهایی تغییر بیان ژن تعیین نمود. آنالیز کامپیوتری ریزآرایه‌های تولیدی طی دوره زمانی می‌توانند ژن‌هایی را دسته‌بندی کنند که به‌نظر می‌رسد هماهنگ بیان می‌شوند. آنالیز دسته‌ای[2] امکان تعیین هویت ژن‌های بالقوه‌ای را فراهم می‌سازد که تغییر سلول از یک حالت به حالت دیگر را هماهنگ می‌کنند.

ریزآرایه‌های پروتئینی با آنتی‌بادی‌ها یا پروتئین‌های غیرآنتی‌بادی تولید می‌شوند که بر روی اسلایدها یا صافی‌هایی ثابت شده‌اند که می‌توانند پروتئین‌های هدف را به طریق مشابه روش مورد استفاده در ریزآرایه‌های DNA تسخیر کنند. پروب‌های پروتئینی دیگر برای ریزآرایه‌های پروتئینی نظیر قطعات کوتاه DNA یا RNA سنتزشده (آپتامر) در حال ابداع هستند که به‌طور انتخابی به پروتئین‌های اختصاصی اتصال می‌یابند. ریزآرایه‌های پروتئینی عموماً با پروتئین‌های نوترکیبی تولید می‌شوند که ممکن است از کتابخانه‌های بیانی cDNA اختصاصی - بافت تولید گردند. این ریزآرایه‌ها به راحتی با آنتی‌بادی‌های اختصاصی آنالیز می‌شوند که به‌طریق فلورسنت نشاندار شده‌اند. این رهیافت به‌طور موفقیت‌آمیزی برای جستجوی مجموعه آنتی‌بادی در پلاسمای انسانی مرتبط با برخی بیماری‌های خود-ایمنی بکار رفته است.

تکنیک‌های ریزآرایه برای آنالیز بیان ژنومی و وضعیت پروتئومیک سلول‌ها در سلول‌های طبیعی، در مقایسه با الگوهای موجود در سلول‌هایی که به دلیل تغییراتی نظیر وجود یک محیط متابولیکی تغییریافته، تمایز، پاسخ به داروها، پاسخ به فاکتورهای رشد، یا یک حالت بیماری، بسیار مهم هستند.

ژنوم انسانی

تا سال ۱۹۹۶ ژنوم مخمر، یک اوکاریوت، با حدود 14×10^6 جفت باز موجود در ۱۶ کروموزوم آن تعیین توالی شد. ژنوم نماتود ***C.elegans*** که تا ۱۹۹۸ تعیین توالی شده بود که

1. Microchips   2. Cluster analysis

شامل ۱۸۰۰۰ ژن در مقایسه با ۶۰۰۰ ژن مخمر، است. رهیافت تعیین توالی تفنگ-شکاری[1] برای تعیین توالی اساساً کل 180×10^6 جفت بازی مگس میوه *Drosophila melanogaster* مورد استفاده قرار گرفت. در این روش، کل ژنوم به قطعات کوچک شکسته می‌شود، قطعات با یک روش خودکار سریع تعیین توالی می‌گردند، و همایش قطعات تعیین توالی‌شده به کمک توالی‌های همپوشان و یک ابرکامپیوتر با ترتیب مناسب انجام می‌شود. دسترسی به توالی‌های از قبل کلون‌شده سبب تسهیل در تعیین‌توالی می‌گردد.

رهیافت تعیین توالی تفنگ‌شکاری جهت افزایش سرعت تعیین‌توالی ژنوم انسان مورد استفاده قرار گرفت. تاکنون چندین کروموزوم انسانی نقشه‌برداری و هزاران کلون cDNA تعیین توالی شده‌اند و یا آماده تعیین توالی هستند که در نهایت نشانه‌هایی از نقشه ژنتیکی بزرگ انسان را فراهم می‌کنند. در سال ۲۰۰۰، ونتر و کولین[2] با مشارکت یکدیگر اعلام نمودند که گروه‌های خود ۹۷٪ ژنوم انسان را تعیین توالی کرده‌اند.

تعیین یک توالی ژنومی تنها قسمتی از پازل ژنومی است. جایگاه شروع و توقف هر ژن همراه با چیزی که ژن کد می‌کند می‌بایست برای فرایندی تحت عنوان تفسیر[3] تعیین شود. ژنوم‌های اوکاریوتی معمولاً حاوی نواحی دائماً متراکم یا هتروکروماتین در اطراف سانترومرها هستند. این نواحی حاوی DNA تکراری است که توسط هیچکدام از روش‌های تعیین‌توالی رایج کلون و تعیین‌توالی نمی‌شود. ممکن است تعیین کامل تمامی ژن‌ها و عناصر تنظیمی دهها سال طول بکشد.

تکمیل طرح ژنوم انسانی همراه با تولید داده‌های بسیار زیادی بود. انجام این طرح فقط شروع شناخت ما از پایه‌های ملکولی نحوه عملکرد یک سلول، چه رسد به یک موجود، است. هم اکنون معتقدند که انسان حدود ۰۰۰ ۳۰ ژن کد می‌کند که بسیار کمتر از میزان پیش‌بینی‌شده و حدود ۳۰٪ بیش از یک ژنوم گیاهی و حدود ۴۰٪ بیش از *C.elegans* (کرم گرد) می‌باشد. هر چند، رونوشت‌های RNA ژنوم «ساکن» همانند محصولات پروتئینی ترجمه شده آنها نسبتاً «پویا» هستند. اسپلایس متفاوت رونوشت اولیه RNA منجر به تولید محصولات پروتئینی مختلفی از یک ژن می‌شود (ص ۴۰۴). محصولات پروتئینی همچنین ممکن است دچار تغییرات شیمیایی وسیع شده و به سایر زیرواحدهای پپتیدی یا پروتئین‌ها اتصال یابند. برآورد می‌شود که نهایتاً این ۰۰۰ ۳۰ ژن منجر به تولید ۰۰۰ ۲۰۰ تا ۲ میلیون محصول پروتئینی گردد که بیان آنها تا حدودی بستگی به ویژگی بافتی، مرحله نمو، و شرایط متابولیک دارد. هم اکنون وظیفه ما آنالیز رونوشت‌ها و محصولات نهایی ترجمه آنها در سطح ساختمانی و عملکردی است.

ترسیم تمامی ژن‌های انسانی و توالی‌های تنظیمی آنها می‌بایست سبب افزایش قابل توجه شناخت ما از بیماری‌های ژنتیکی متعدد شود. پیشرفت‌های حاصل در فناوری‌های مربوط به دستکاری ژن‌ها و بیان ژن می‌بایست راه‌هایی را برای کنترل یا معالجه بسیاری

1. Shotgun sequencing 2. J.C.Venter and F.S.Collins 3. Annotation

از بیماری‌ها فراهم کند. بیماری‌های ژنتیکی می‌بایست نهایتاً با درمان جایگزینی ژنی معالجه شود؛ کارآزمایی‌های بالینی محدود در زمینه ژن درمانی آغاز شده‌اند. با توجه به پیشرفت‌های وسیع در بیولوژی ملکولی طی سه دهه گذشته، منطقی است که اعتقاد داشته باشیم این زمان زیاد دور نیست. چالش قدیمی که در مقابل دانشمندان قرار داشت، نحوه تعیین توالی ژنوم انسان بود؛ چالش جدید این است که چطور به شکل مؤثری این اطلاعات را دستکاری کنیم تا برای بشریت مفید باشد.

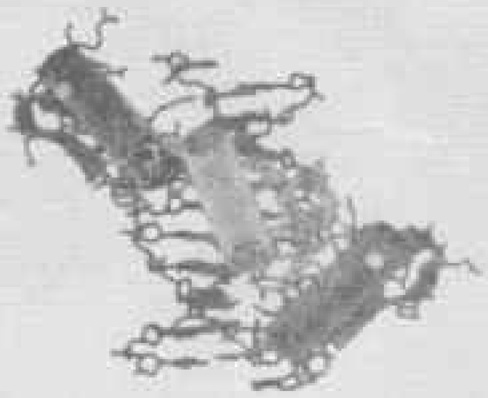
واژه‌های کلیدی

- واکنش زنجیری پلیمراز (PCR)
- nested PCR
- PCR زمان واقعی کمّی
- آندونوکلئاز محدودکننده
- نقشه‌های محدودکننده
- دی‌داکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات
- تعیین‌توالی مستقیم
- تعیین‌توالی رنگ-خاتمه‌دهنده
- DNA نوترکیب
- پلاسمیدها
- جایگاه پلی‌کلونینگ
- PCR مولتی‌پلکس
- غیرفعال‌سازی الحاقی
- تکمیل‌سازی α
- DNA مکمل (cDNA)
- نورترن بلات
- چندشکلی طول قطعه محدودکننده (RFLP)
- ساترن بلات
- چندشکلی کونفورماسیون تک-رشته (SSCP)
- هیبریدیزاسیون درجا
- آزمون حفاظت نوکلئازی
- آزمون شیفت حرکت الکتروفورتیک (EMSA)
- کتابخانه‌های باکتریوفاژ
- ناقل کاسمیدی
- کروموزوم‌های ساختگی باکتریایی (BACS)
- کروموزوم‌های ساختگی مخمر (YACS)
- قدم‌زدن کروموزومی
- حیوانات ترانس‌ژنیک
- ناقلین بیانی
- پروتئین ادغامی
- ترانس‌فکشن
- جهش‌زایی هدایت‌شده-جایگاهی
- جهش‌زایی PCR معکوس
- اسیدهای نوکلئیک ضدمعنی
- icroRNAs
- RNA مداخله‌گر-کوچک (siRNA)
- ژن درمانی
- موش‌های خانگی ناتوان‌شده
- سلول‌های پلوری‌پوتنت
- ژنومیک
- آنالیز ریزآرایه
- پروتئومیک
- تعیین‌توالی تفنگ‌شکاری



۸

تنظیم بیان ژن



مفاهیم کلیدی

- رونوشت‌هایی که توسط ارگانیسم‌های پروکاریوتی کد می‌شوند، اغلب پلی - سیسترونی هستند که خود شامل گروه‌هایی از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دارای عملکرد مرتبط می‌باشند که همگی تحت کنترل مشترک قرار دارند.
- رونویسی می‌تواند در پاسخ به پیام‌های تغذیه‌ای، محیطی یا سلولی دیگر، فعال یا سرکوب گردد. هدف پاسخ‌های تنظیمی، فراهم‌سازی بیان ژنی مناسب برای شرایط موجود، اغلب با به‌کارگیری ملکول‌های کوچکی است که به‌عنوان کمک تنظیم‌گر نشانگر شرایط سلولی هستند.
- کنترل رونویسی اغلب وابسته به پروتئین‌های اتصالی توالی - اختصاصی است. موتیف‌های اسید آمینه‌ای پروتئین‌های اتصالی توالی - اختصاصی موردشناسایی قرار گرفته‌اند که امکان گروه‌بندی فاکتورهای رونویسی براساس شباهت‌های ساختمانی را فراهم می‌کنند.
- شناسایی توالی‌های DNAای که به فاکتورهای رونویسی اتصال می‌یابند، ممکن است به شناسایی ژن‌هایی کمک کند که به‌طور هماهنگ تنظیم می‌شوند. پروموترهای اوکاریوتی اغلب جایگاه‌های متعددی برای اتصال به فاکتورهای رونویسی دارند و ترکیباتی از فاکتورهای رونویسی را برای تنظیم بیان ژن به‌کار می‌گیرند.

۱-۸ • مقدمه

موجودات زنده برای ادامه حیات می‌بایست به تغییرات محیطی پاسخ دهند. یکی از راه‌های تنظیم نسبت به این تغییرات، تغییر بیان ژن‌های اختصاصی است؛ این تغییر بر روی تعداد ملکول‌های پروتئین مربوطه در سلول اثر می‌گذارد. در این فصل بر روی برخی مکانیسم‌های ملکولی متمرکز می‌شویم که تعیین می‌کنند در چه زمانی و به چه میزانی یک ژن خاص بیان شود. شناخت نحوه تنظیم بیان ژن‌ها، یکی از فعال‌ترین عرصه‌های تحقیقات بیوشیمیایی امروزی است.

در *E.coli* حدود ۴۳۰۰ پروتئین مختلف وجود دارد، ولی این باکتری نیاز ندارد که تمامی آنها را در یک زمان سنتز کند. تشریح کلاسیک تنظیم بیان ژن باکتریایی را می‌توان با بررسی تنظیم ژن مربوط به β-**گالاکتوزیداز** انجام داد که دی‌ساکارید لاکتوز را به گلوکز و گالاکتوز تجزیه می‌کند. وقتی *E.coli* در محیط حاوی گلوکز به‌عنوان منبع کربن رشد می‌کند، تنها پنج ملکول از این آنزیم در هر سلول وجود دارد. هر چند، وقتی لاکتوز به‌عنوان تنها منبع کربن است، ۵۰۰۰ یا تعداد بیشتری ملکول وجود دارد. لذا وقتی باکتری‌ها نیاز به متابولیزه‌کردن لاکتوز دارند، سنتز β-گالاکتوزیداز را افزایش می‌دهند. در صورتی‌که لاکتوز از محیط برداشت شود، سنتز این آنزیم به سرعتی که شروع شد، متوقف می‌گردد.

سلول‌های اوکاریوتی مکانیسم‌های وسیع‌تری نسبت به سلول‌های پروکاریوتی برای تنظیم ژن دارند. سلول‌های تمایزیافته ارگانیسم‌های عالی، یک ساختمان شدیداً پیچیده و اغلب یک عملکرد بیولوژیکی تخصص‌یافته دارند که براساس بیان ژن‌های آنها تعیین می‌گردد. برای مثال، **پره‌پروانسولین** در سلول‌های β پانکراس، و نه در سلول‌های کلیه سنتز می‌شود، در حالی که هسته تمامی سلول‌های بدن ژن مربوط به پره‌پروانسولین را دارند. طی نمو موجود زنده، وجود پروتئین‌ها در انواع اختصاصی سلول‌ها، شدیداً نسبت به زمان و نوع حوادث مربوط به نمو کنترل می‌گردد.

اطلاعات بیشتری در خصوص تنظیم ژن در پروکاریوت‌ها نسبت به اوکاریوت‌ها وجود دارد. به‌علاوه، مطالعات انجام‌شده بر روی پروکاریوت‌ها اغلب تفکرات مهیج جدیدی را به‌وجود می‌آورند که می‌توان آنها را در سلول‌های اوکاریوتی مورد آزمایش قرار داد و این برای ابداع درمان‌های منطقی بیماری‌های حاصل از باکتری‌ها مهم می‌باشد.

به چندین مثال تنظیم بیان ژن در باکتری‌ها می‌پردازیم که به‌خوبی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و در ادامه به مثال‌هایی در خصوص فاکتورهای رونویسی پروتئینی متعددی می‌پردازیم که بیان ژن‌ها را در ژنوم انسان تنظیم می‌کنند.

۲-۸ • واحد رونویسی در باکتری‌ها: اپرون

کروموزوم *E.coli* یک ملکول DNA دو رشته حلقوی با ۴/۶ میلیون جفت باز می‌باشد که تمامی توالی آن تعیین شده است. بیشتر حدود ۴۳۰۰ ژن آن به‌طور تصادفی پراکنده

شده‌اند؛ ولی ژن‌های کدکننده‌های آنزیم‌های یک مسیر متابولیکی خاص به صورت دستجاتی در نواحی از DNA وجود دارند. به‌طور مشابه، ژن‌های مرتبط با پروتئین‌های ساختمانی، نظیر حدود ۷۰ پروتئینی که ریبوزوم را تشکیل می‌دهند، اغلب در کنار یکدیگر قرار دارند. مجموعه ژن‌های دسته‌شده، معمولاً به‌طور هماهنگ تنظیم می‌شوند؛ یعنی، این ژن‌ها به صورت یک ملکول mRNA پلی سیسترونی [1] رونویسی می‌شوند که حاوی توالی‌های کدکننده پروتئین‌های مختلفی هستند. واژه **اپرون** اشاره به واحد تنظیمی کامل یک مجموعه از ژن‌های دسته‌شده دارد. اجزاء این واحد عبارتند از **ژن‌های ساختمانی** برای آنزیم‌های مرتبط یا پروتئین‌های مرتبط، یک **ژن تنظیمی** یا ژن‌های کدکننده پروتئین(های) تنظیمی، و **عناصر کنترلی** یا جایگاه‌هایی بر روی DNA در نزدیکی ژن‌های ساختمانی که پروتئین‌های تنظیمی در آنها عمل می‌کنند. شکل ۱-۸ یک نقشه ژنتیکی نسبی از ژنوم *E.coli* را نشان می‌دهد که موقعیت ژن‌های ساختمانی برخی اپرون‌های *E.coli* بر روی آن مشخص شده‌اند.

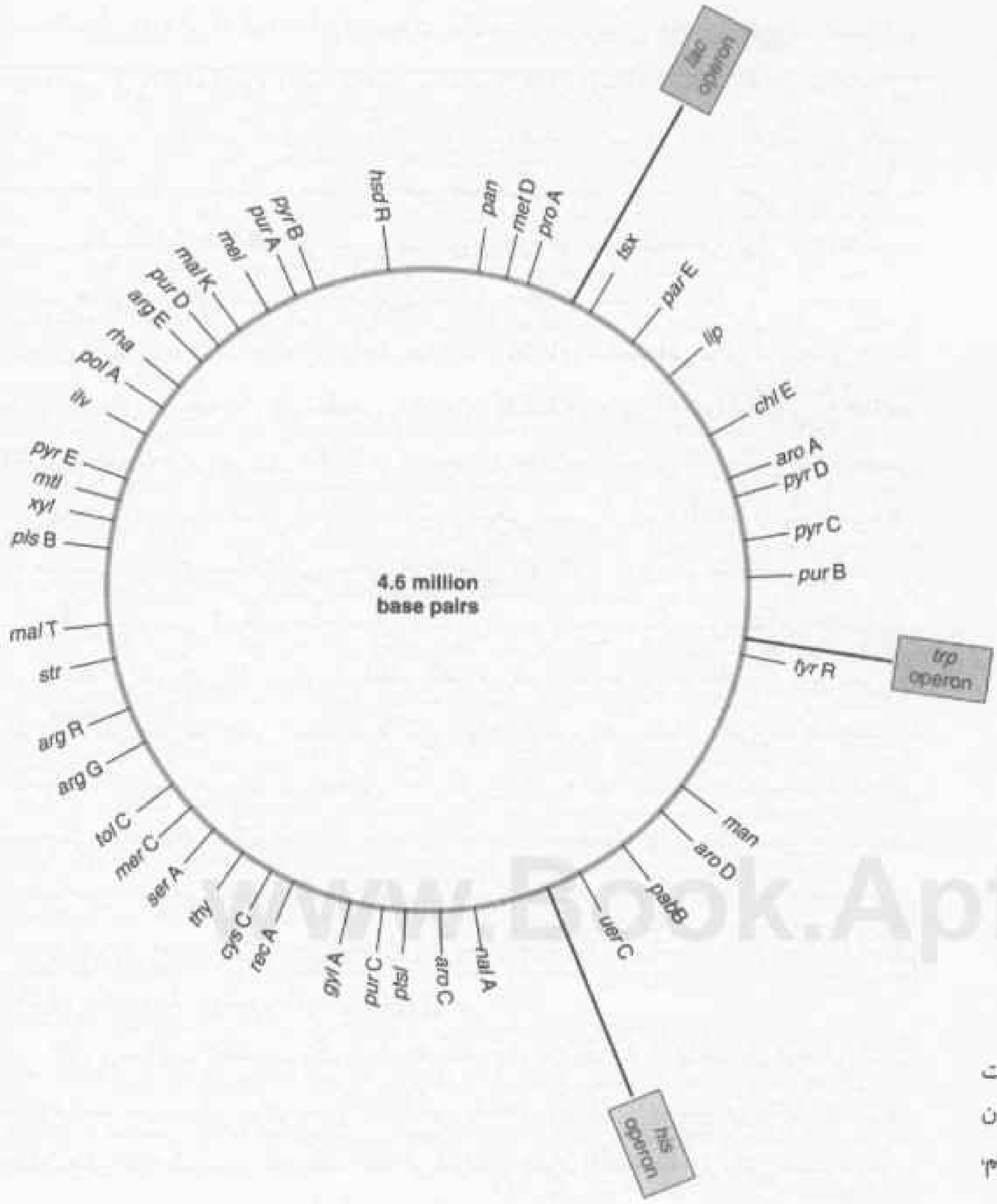
وقتی رونویسی ژن‌های ساختمانی یک اپرون در پاسخ به یک سوبسترای اختصاصی در محیط افزایش می‌یابد، به این اثر **القاء** [2] گفته می‌شود. نمونه این اثر، افزایش رونویسی ژن β-گالاکتوزیداز در زمانی است که لاکتوز تنها منبع کربن می‌باشد. باکتری‌ها همچنین با خاموش‌سازی سریع سنتز آنزیم‌هایی که دیگر نیازی به آنها نیست، به تغییرات تغذیه‌ای پاسخ می‌دهند. برای مثال، *E.coli* تریپتوفان را به‌عنوان محصول نهایی یک مسیر بیوسنتتیک اختصاصی سنتز می‌کند. هرچند، در صورتی که تریپتوفان در محیط وجود داشته باشد، سنتز آنزیم‌های این مسیر متوقف می‌گردد. این فرایند را **سرکوب** [3] گویند که مانع استفاده انرژی باکتری برای تولید پروتئین‌های غیرضروری می‌شود.

القاء و سرکوب تظاهرات یک پدیده هستند. پیام هر کدام از اینها ملکول کوچکی است که به ترتیب سوبسترایی برای مسیر متابولیکی یا محصولی از یک مسیر می‌باشد. وقتی این ملکول‌های کوچک سبب تحریک القاء می‌شوند به عنوان **القاءکننده** [4]، و وقتی سبب سرکوب می‌شوند به عنوان **کمک‌سرکوبگر** [5]، مورد اشاره قرار می‌گیرند.

۳-۸ • اپرون لاکتوز در *E.coli*

اپرون لاکتوز سه ژن ساختمانی مجاور دارد (شکل ۲-۸). *LacZ* آنزیم β-گالاکتوزیداز را کد می‌کند که متشکل از چهار زیرواحد یکسان هر کدام با ۱۰۲۱ اسید آمینه می‌باشد. *LacY* کدکننده پرمئاز است که یک پروتئین ۲۷۵ اسید آمینه‌ای موجود در غشاء سلول است که در عبور قندهایی نظیر لاکتوز از عرض غشاء همکاری دارد. *LacA* تیوگالاکتوزید ترانس-استیلاز را کد می‌کند که یک آنزیم ۲۷۵ اسید آمینه‌ای است و یک گروه استیل را از استیل-کوآ به β-گالاکتوزیدازها انتقال می‌دهد. از میان این سه پروتئین، β-گالاکتوزیداز در یک مسیر متابولیکی شناخته‌شده همکاری دارد. پرمئاز به عبور لاکتوز از عرض غشاء کمک

1. Polycistronic 2. Induction 3. Repression 4. Inducer 5. Corepressor

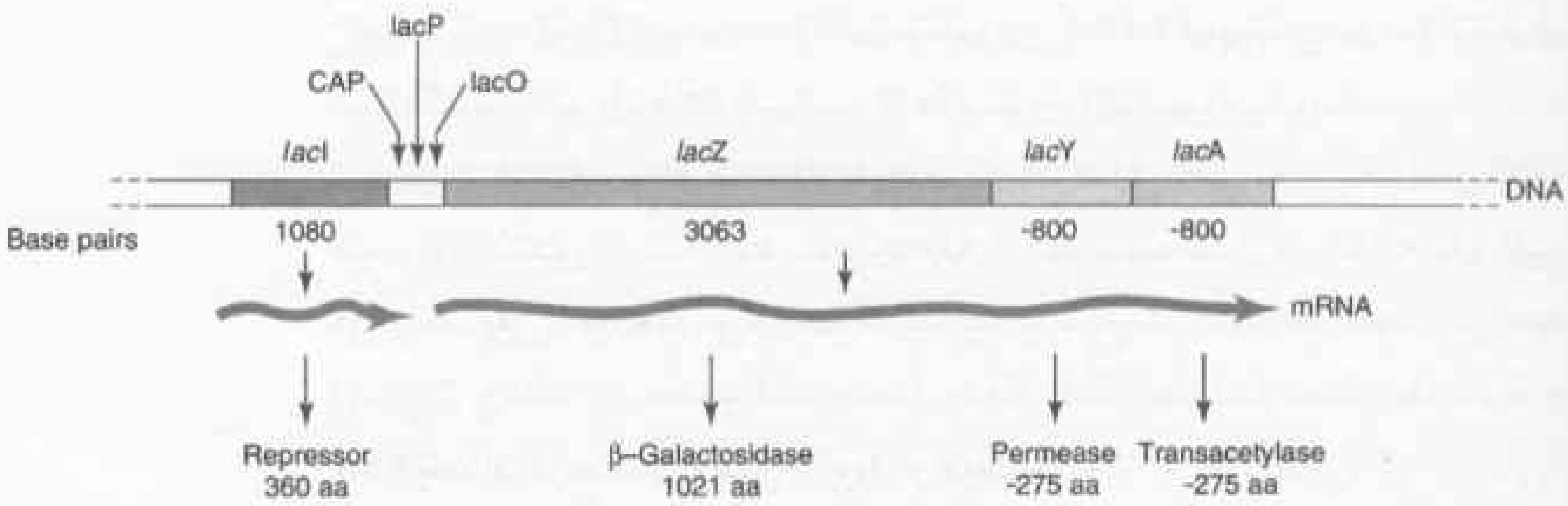


شکل ۱-۸ نقشه ژنتیکی حدودی *E.coli*. موقعیت چند مورد از ۴۳۰۰ ژن موجود در ژنوم حلقوی *E.coli* نشان داده شده است. سه اپرونی که در این فصل به آنها می‌پردازیم، نشان داده شده‌اند.

می‌کند. ترانس‌استیلاز ممکن است با سم‌زدایی و واکنش‌های دفع آنالوگ‌های غیرقابل متابولیسم β–گالاکتوزیدها ارتباط داشته باشد.

جهش‌های *lacZ* و *lacY* که β–گالاکتوزیداز و پرومئاز را غیرفعال می‌کنند، به ترتیب مانع از تجزیه لاکتوز و برداشت آن از محیط می‌شوند. به‌نظر نمی‌رسد جهش‌های ***lacA*** که سبب غیرفعال‌سازی ترانس‌استیلاز می‌شوند، اثری بر روی رشد و تقسیم سلولی داشته باشند.

تنها ملکول mRNAای که حاوی توالی‌های کدکننده هر سه این ژن‌های ساختمانی است، از **پروموتری**، تحت عنوان lacP، رونویسی می‌شود که درست در فرادست *lacZ* قرار دارد. القاء این ژن‌ها طی شروع رونویسی آنها رخ می‌دهد. بدون القاءکننده، رونویسی به میزان بسیار کمی انجام می‌شود. در حضور القاءکننده، رونویسی از ***lacP*** آغاز و از میان هر سه ژن عبور کرده تا به یک خاتمه‌دهنده رونویسی برسد که قدری بعد از ***lacA*** قرار دارد.



شکل ۲–۸ **اپرون لازم *E.coli*.** اجزاء اپرون لاکتوز عبارتند از ژن *lac*I برای کدنمودن یک سرکوبگر؛ عناصر کنترلی CAP، *lac*P و سه ژن ساختمانی *lac*Z، *lac*Y و *lac*A که به ترکیب β–گالاکتوزیداز، یک پرمئاز و یک ترانس‌استیلاز را کد می‌کنند. ژن *lac*I از پروموتر خود رونویسی می‌شود. سه ژن ساختمانی از پروموتر *lac*P رونویسی شده تا تولید یک mRNA پلی‌سیسترونی شود که از آن سه پروتئین حاصل می‌گردد.

لذا این ژن‌ها **به‌طور هماهنگ بیان می‌شوند**؛ یا همگی آنها به‌صورت واحد رونویسی می‌شوند و یا هیچکدام رونویسی نمی‌شوند.

وجود سه توالی کدکننده بر روی یک ملکول mRNA نشان می‌دهد که میزان نسبی این سه پروتئین همیشه در شرایط مختلف القاء، یکسان می‌باشد. القاءکننده یک سوییچ ملکولی است که بر روی سنتز یک نوع mRNA مربوط به هر سه ژن تأثیر می‌گذارد. هر چند، به دلیل تفاوت در سرعت ترجمه و تخریب خود این پروتئین‌ها، میزان هر کدام از آنها اغلب متفاوت می‌باشد.

نیمه–عمر mRNAای که توسط لاکتوز القاء شده است، حدود سه دقیقه می‌باشد. لذا بیان این اپرون می‌تواند سریعاً تغییر پیدا کند. به محض این که دیگر القاءکننده وجود نداشته باشد، رونویسی متوقف شده، ملکول‌های mRNA موجود ظرف چند دقیقه ناپدید شده و سلول‌ها سنتز پروتئین را متوقف می‌سازند.

سرکوبگر اپرون لاکتوز یک پروتئین قابل انتشار است

ژن تنظیمی اپرون لاکتوز، یعنی *lac*I **سرکوبگر** لاکتوز را کد می‌کند که تنها فعالیت آن در کنترل شروع رونویسی ژن‌های ساختمانی *lac* می‌باشد. *lac*I درست در فرادست عناصر کنترل‌کننده دسته *lac*ZYA قرار دارد. هر چند، ضرورتی ندارد که ژنی که یک دسته ژنی را کنترل می‌کند، در نزدیکی آنها قرار داشته باشد. رونویسی *lac*I تحت تنظیم قرار ندارد؛ این ژن از پروموتر خود با سرعتی رونویسی می‌شود که نسبتاً مستقل از وضعیت سلولی است.

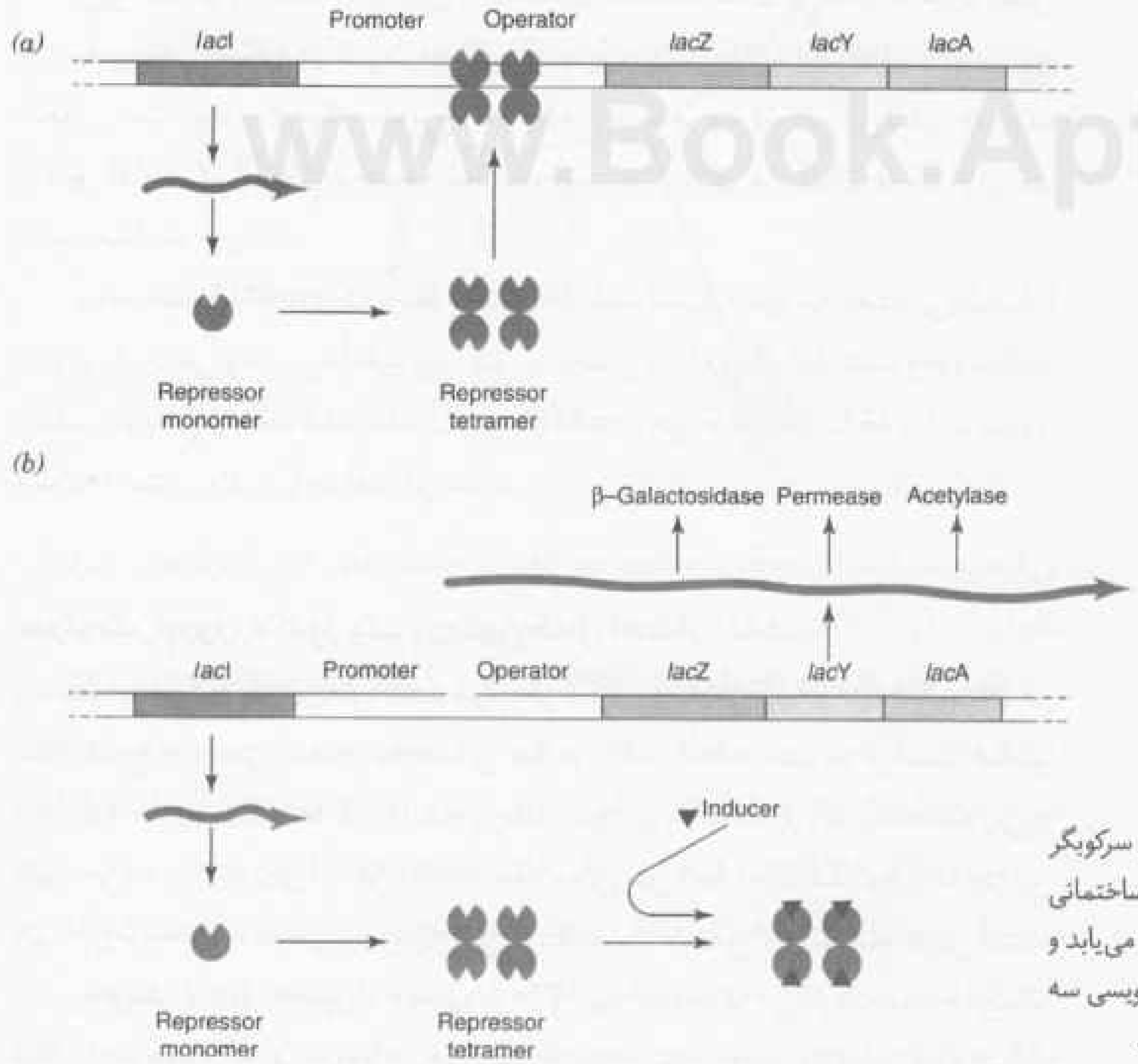
سرکوبگر لاکتوز به‌صورت منومری با ۳۶۰ اسید آمینه سنتز می‌شود که یک هُموتترامر فعال را به وجود می‌آورد. معمولاً در هر سلول حدود ۱۰ تترامر وجود دارد. این تترامر تمایل بالایی برای جایگاه اصلی اتصال به DNA خود، تحت عنوان **اپراتور** یا *lac*O دارد که بین

*lac*P و *lac*Z قرار گرفته است. *Lac*O تا حدودی با *lac*P همپوشانی دارد، لذا اتصال سرکوبگر مانع اتصال **RNA پلیمراز** به *lac*P و شروع رونویسی می‌شود.

غیر از شناسایی و اتصال به *lac*O، این سرکوبگر تمایل بالایی برای ملکول‌های القاء-کننده اپرون لاکتوز دارد. هر منومر به یک ملکول القاءکننده اتصال می‌یابد که یک تغییر کونفورماسیونی را به وجود می‌آورد که شدیداً تمایل سرکوبگر به *lac*O را کاهش می‌دهد (شکل ۳-۸). لذا در حضور القاءکننده، سرکوبگر دیگر به *lac*O اتصال پیدا نکرده و **RNA پلیمراز** شروع به رونویسی از پروموتر می‌کند.

مطالعه اپرون لاکتوز با کشف این موضوع بسیار تسهیل شد که برخی ملکول‌های کوچک، نظیر ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید[1] (IPTG)، به‌طور اتفاقی به عنوان القاءکننده عمل می‌کنند، ولی توسط β-گالاکتوزیداز متابولیزه نمی‌شوند. این **القاءکننده‌های مجانی**[2] همانند القاء-کننده به ملکول سرکوبگر اتصال می‌یابند.

پروتئین سرکوبگر به صورت ترانس عمل می‌کند؛ یعنی می‌تواند به محل فعالیت خود انتشار یابد. برخی جهش‌های *lac*I سبب تعویض یا حذف اسیدهای آمینه‌ای از سرکوبگر



شکل ۳-۸ **کنترل اپرون لاکتوز.** (*a*) تترامر سرکوبگر به اپراتور اتصال یافته و مانع رونویسی ژن‌های ساختمانی می‌شود. (*b*) القاءکننده به تترامر سرکوبگر اتصال می‌یابد و از اتصال سرکوبگر به اپراتور جلوگیری می‌کند. رونویسی سه ژن ساختمانی می‌تواند از پروموتر صورت گیرد.

1. Isopropylthiogalactoside
2. Gratuitous inducers

می‌شوند که قسمتی از جایگاه اتصالی برای القاءکننده هستند. این تغییرات بر روی تمایل سرکوبگر به اپراتور تأثیر نمی‌گذارد، به همین دلیل سرکوبگر همیشه، و حتی در حضور القاءکننده، متصل به اپراتور باقی‌مانده و ژن‌های *lac*ZYA هرگز به میزان بیش از سطح بسیار پایین پایه، رونویسی نمی‌شوند. جهش‌های دیگر *lac*I سبب تغییر اسیدهای آمینه در جایگاه اتصال به اپراتور می‌شوند و تمایل سرکوبگر به اپراتور را کاهش می‌دهند. بنابراین، سرکوبگر نمی‌تواند به اپراتور اتصال یابد و ژن‌های *lac*ZYA به‌طور دائمی رونویسی می‌شوند. این نوع جهش‌ها از انواع **جهش‌های سرکوبگر - دائمی**[1] هستند، زیرا ژن‌های *lac* به‌طور دائمی بیان می‌شوند. موارد نادری از جهش‌های *lac*I سبب افزایش تمایل سرکوبگر به اپراتور می‌شوند. در این موارد، ملکول‌های القاءکننده می‌توانند به سرکوبگر اتصال یابند، ولی در آزادسازی سرکوبگر از اپراتور کمتر مؤثر می‌باشند.

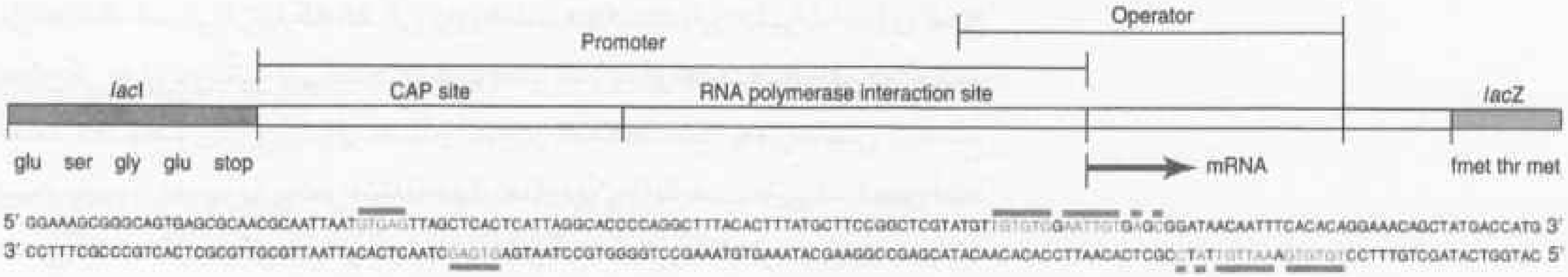
جهش‌های سرکوبگر - دائمی خصوصیاتی از یک سیستم کنترل منفی را تشریح می‌کنند. یک سرکوبگر فعال، در غیاب یک القاءکننده، بیان ژن‌های ساختمانی *lac* را خاموش می‌کند. یک سرکوبگر غیرفعال منجر به بیان دائمی تنظیم‌نشده این ژن‌ها می‌شود. با استفاده از تکنیک‌های DNA نوترکیبی که در فصل ۷ شرح داده شدند، یک پلاسمید حاوی *lac*I نوع - وحشی (ولی بدون بقیه اپرون لاکتوز) را می‌توان به سلول‌های جهش‌یافته *lac*I ارائه داد. این نوع سلول‌ها هر دو ملکول سرکوبگر فعال و غیرفعال را سنتز می‌کنند. تحت این شرایط، تنظیم طبیعی نوع - وحشی اپرون لاکتوز رخ می‌دهد. لذا به زبان ژنتیکی، القاء نوع - وحشی نسبت به جهش دائمی[2] غالب است.

توالی اپراتوری اپرون لاکتاز در مجاورت یک پروموتر و سه ژن ساختمانی قرار دارد

عناصر کنترلی فرادست ژن‌های ساختمانی اپرون لاکتوز شامل اپراتور و پروموتر می‌باشند. همانند *lac*I، این اپراتور به‌واسط جهش‌هایی مورد شناسایی قرار گرفت که بر روی رونویسی ناحیه *lac*ZYA تأثیر می‌گذارند. برخی از این جهش‌ها منجر به سنتز دائمی *lac* mRNA می‌شوند؛ یعنی از انواع **جهش‌های اپراتور - دائمی**[3] هستند. در این موارد به دلیل وجود یک یا چند تغییر جفت بازی در توالی اپراتوری DNA سرکوبگر دیگر نمی‌تواند به‌طور محکم به آن متصل شود. بنابراین، سرکوبگر اثر کمتری در جلوگیری از شروع رونویسی توسط RNA پلیمراز دارد.

برعکس جهش‌های *lac*I که سرکوبگر قابل انتشار را کد می‌کند، جهش‌های اپراتور سبب تغییر در یک پروتئین قابل انتشار نمی‌شوند. آنها تنها بر روی رونویسی سه ژن *lac* موجود در فرودست این اپراتور بر روی همان ملکول DNA تأثیر دارند. در صورتی که اپرون لاکتوز دیگری در یک پلاسمید نوترکیبی به داخل یک باکتری ارائه گردد، اپراتور یک اپرون

1. Repressor-constitutive mutations 2. Mutant constitutivity 3. Operator-constitutive mutations



شکل ۴-۸ توالی‌های نوکلئوتیدی عناصر کنترلی اپرون لاکتوز. انتهای ژن *lacI* (کدکننده سرکوبگر لاکتوز) و شروع ژن *lacZ* (کدکننده β-گالاکتوزیداز) نیز نشان داده شده‌اند. خطوط بالا و پایین توالی، توالی‌های مشترک موجود در جایگاه CAP و اپراتور را نشان می‌دهند.

تأثیری بر عملکرد اپرون دیگر ندارد. لذا یک اپرون دارای یک اپراتور نوع-وحشی، تحت شرایط معمول سرکوب خواهد شد، در حالی که در همان باکتری مهندسی‌شده یک اپرون دوم با یک جهش اپراتور-دائمی دائماً رونویسی می‌گردد.

جهش‌های اپراتور را غالباً تحت عنوان **سیس-غالب**[1] مورد اشاره قرار می‌دهند تا بر اثر آنها بر روی ژن‌های مجاور موجود در همان ملکول DNA تأکید شود. جهش‌های سیس-غالب در توالی‌هایی از DNA رخ می‌دهند که توسط پروتئین‌ها مورد شناسایی قرار می‌گیرند، نه در توالی‌هایی از DNA که پروتئین‌های قابل‌انتشار را کد می‌کنند. جهش‌های **ترانس-غالب**[2] در ژن‌هایی رخ می‌دهند که محصولات قابل‌انتشار را کد می‌کنند. لذا جهش‌های سیس-غالب در پروموتر و توالی‌های خاتمه رونویسی نیز رخ می‌دهند، در حالی‌که جهش‌های ترانس-غالب همچنین در ژن‌هایی رخ می‌دهند که مربوط به زیرواحدهای پروتئینی RNA پلیمراز، پروتئین‌های ریبوزومی و غیره هستند.

شکل ۴-۸ توالی اپراتور و پروموتر *lac* را نشان می‌دهد. توالی اپراتوری یک محور **تقارن دوطرفه**[3] دارد. توالی رشته بالایی در سمت چپ اپراتور تقریباً یکسان با این توالی در رشته پایینی در سمت راست می‌باشد؛ تنها سه تفاوت وجود دارد. این تقارن در توالی شناسایی DNA انعکاسی از تقارن در سرکوبگر تترامری است و اتصال محکم زیرواحدهای سرکوبگر به اپراتور را تسهیل می‌کند. تقارن دوطرفه در توالی DNA دو-رشته، یک ویژگی معمول بسیاری از جایگاه‌های اتصال به پروتئین یا شناسایی، شامل اکثر جایگاه‌های شناسایی برای آنزیم‌های محدودکننده، است.

اپراتور *lac* با ۳۰ bp یک جزء بسیار کوچک در کل ژنوم *E.coli* است و حتی جزء به مراتب کوچکتری از حجم سلول را شامل می‌شود. البته حدود ۱۰ سرکوبگر تترامری نیز در محدوده کوچکی از حجم سلول قرار دارند. از آنجایی که ژن سرکوبگر بسیار نزدیک به اپراتور *lac* می‌باشد، در صورتی که ترجمه سرکوبگر قبل از سنتز کامل mRNA آغاز گردد،

1. *Cis*-dominant 2. *Trans*-dominant 3. Dyad symmetry

این سرکوبگر نباید مسافت زیادی را انتشار یابد. از همه مهمتر، این سرکوبگر یک تمایل عمومی پایین برای تمامی توالی‌های DNA دارد. وقتی القاءکننده به سرکوبگر اتصال می‌یابد، تمایل آن به اپراتور حدود ۱۰۰۰ برابر کاهش می‌یابد، ولی تمایل پایین آن برای توالی‌های اتفاقی DNA تغییری نمی‌کند. از اینرو، تمامی سرکوبگرهای موجود در سلول در ارتباط سُست با DNA قرار دارند. وقتی با اتصال القاءکننده، یک سرکوبگر از اپراتور جدا می‌شود، سریعاً به ناحیه DNA مجاور اتصال می‌یابد. لذا القاء سبب جابه‌جایی سرکوبگر بر روی DNA، به‌جای انتشار آزاد ملکول‌های سرکوبگر، می‌شود.

با توجه به این که برای عبور لاکتوز از عرض غشاء نیاز به پرمئاز می‌باشد، وقتی ژن *lacY* کدکننده پرمئاز در حالت سرکوب قرار دارد، برای اولین بار لاکتوز به چه طریقی وارد سلول می‌شود؟ حتی در حالت سرکوب‌شده، یک میزان پایه بسیار پایین رونویسی اپرون *lac* وجود دارد که پنج تا شش ملکول پرمئاز را در سلول فراهم می‌کند. احتمالاً این میزان برای ورود چند ملکول لاکتوز به داخل سلول و شروع فرایند کافی است.

مشاهده عجیب دیگر این است که لاکتوز القاءکننده طبیعی اپرون لاکتوز نیست. وقتی سرکوبگر از سلول‌های کاملاً القاءشده جدا می‌گردد، ملکول کوچک متصل به هر منومر سرکوبگر، آلولاکتوز، و نه لاکتوز، می‌باشد. همانند لاکتوز، **آلولاکتوز** متشکل از گالاکتوز و گلوکز است، ولی اتصال بین این دو قند متفاوت می‌باشد. طی یک واکنش فرعی β-گالاکتوزیداز که معمولاً لاکتوز را به گالاکتوز و گلوکز تجزیه می‌کند، این دو محصول به آلولاکتوز تبدیل می‌شوند.

لذا چند ملکول لاکتوز برداشت و توسط β-گالاکتوزیداز به آلولاکتوز تبدیل می‌شوند که با اتصال به سرکوبگر، سبب القاء اپرون می‌گردند. تأیید لاکتوز به عنوان القاءکننده واقعی از تجربیاتی حاصل می‌شود که نشان می‌دهند اتصال لاکتوز به سرکوبگر خالص‌شده، سبب افزایش تمایل سرکوبگر به اپراتور می‌گردد. از اینرو، در حالت القاءشده میزان کمی از آلولاکتوز می‌بایست برای غلبه این اثر ضدالقاءکنندگی لاکتوز وجود داشته باشد.

RNA پلیمراز و یک پروتئین تنظیم‌کننده، توالی پروموتری اپرون لاکتوز را شناسایی می‌کند

پروموتر بلافاصله در فرادست اپراتور *lac* قرار دارد. این توالی حاوی جایگاه‌های اتصالی برای RNA پلیمراز و **پروتئین فعالگر کاتابولیتی**[1] (**CAP**؛ **پروتئین گیرنده cAMP**[2] یا **CRP** نیز نامیده می‌شود) می‌باشد (شکل ۴-۸). با به‌کارگیری رهیافت‌های ژنتیکی و بیوشیمیایی، جایگاه اتصال RNA پلیمراز شناسایی شده است. جهش‌های نقطه‌ای و حذف‌ها (یا الحاق‌ها) در این ناحیه به میزان قابل توجهی بر اتصال RNA پلیمراز تأثیر می‌گذارند. دو انتهای توالی که RNA پلیمراز به آن اتصال می‌یابد، با تجربیات حفاظت در برابر DNase

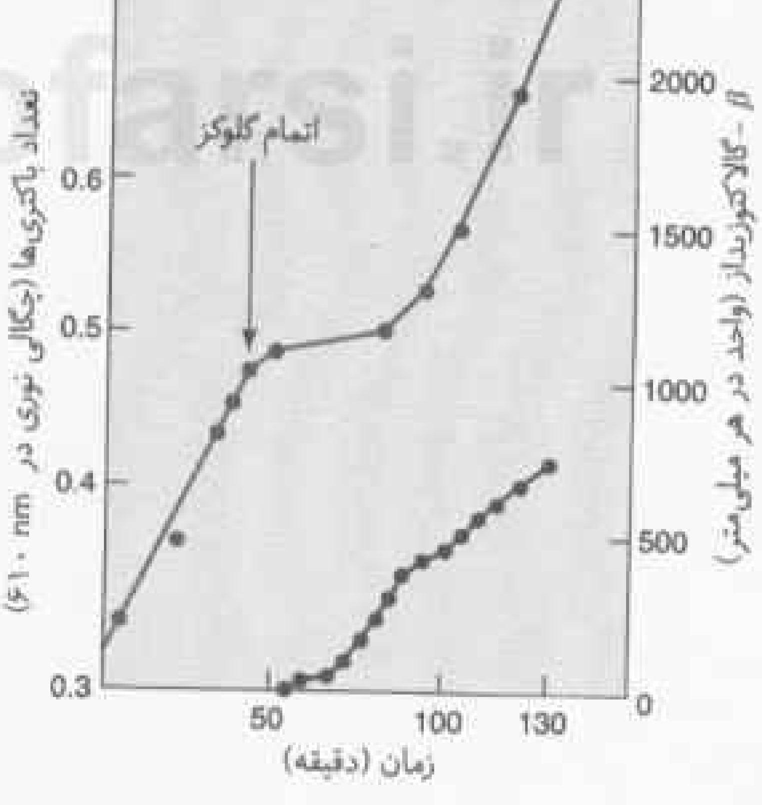
1. Cabolite activator protein   2. cAMP receptor protein

مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. RNA پلیمراز خالص‌شده به ناحیه پروموتری *lac* کلون‌شده در یک DNA باکتریوفاژ یا پلاسمید، اتصال داده شد و سپس این کمپلکس DNA-پروتئین در معرض هضم توسط DNase I قرار گرفت. قطعه DNAای که در برابر تخریب توسط DNase محافظت شده بود، بازیافت و توالی آن تعیین شد. دو انتهای این قطعه حفاظت‌شده قدری در ملکول‌های مختلف DNA متفاوت بودند، ولی ارتباط نزدیکی با مرزهای مربوط به جایگاه اتصال RNA پلیمراز داشتند که در شکل ۴-۸ نشان داده شده‌اند.

جایگاه اتصال RNA پلیمراز فاقد عناصر قرینه مشابه انواع موجود در توالی اپراتوری است. این تعجب‌آور نیست، زیرا RNA پلیمراز می‌بایست به شکل نامتقارن به DNA اتصال یابد تا رونویسی بتواند تنها در یک جهت آغاز گردد. هرچند، قسمتی از توالی پروموتری که توسط CAP شناسایی می‌شود، مقداری تقارن را دارد.

پروتئین فعال‌کننده کاتابولیتی به پروموتر لاکتوز اتصال می‌یابد

به عنوان منبع کربن، *E.coli* گلوکز را به قندهای دیگر ترجیح می‌دهد. برای مثال، در صورتی‌که هم گلوکز و هم لاکتوز در محیط وجود داشته باشد، باکتری‌ها به‌طور انتخابی گلوکز را متابولیزه می‌کنند. شکل ۵-۸ نشان می‌دهد تا زمان ناپدیدشدن گلوکز، β-گالاکتوزیداز ظاهر نمی‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که گلوکز با القاء اپرون لاکتوز تداخل می‌کند، فرایندی که به آن **سرکوب کاتابولیتی**[1] گفته می‌شود، زیرا طی کاتابولیسم گلوکز رخ می‌دهد. اثر مشابه دیگری با اپرون‌های قابل‌القاء دیگر، شامل اپرون‌های آرابینوز و گالاکتوز، مشاهده می‌گردد. این موضوع ممکن است به‌دلیل سیستم هماهنگ‌کننده عمومی برای خاموش‌سازی سنتز آنزیم‌های ناخواسته در هنگام وجود گلوکز باشد.

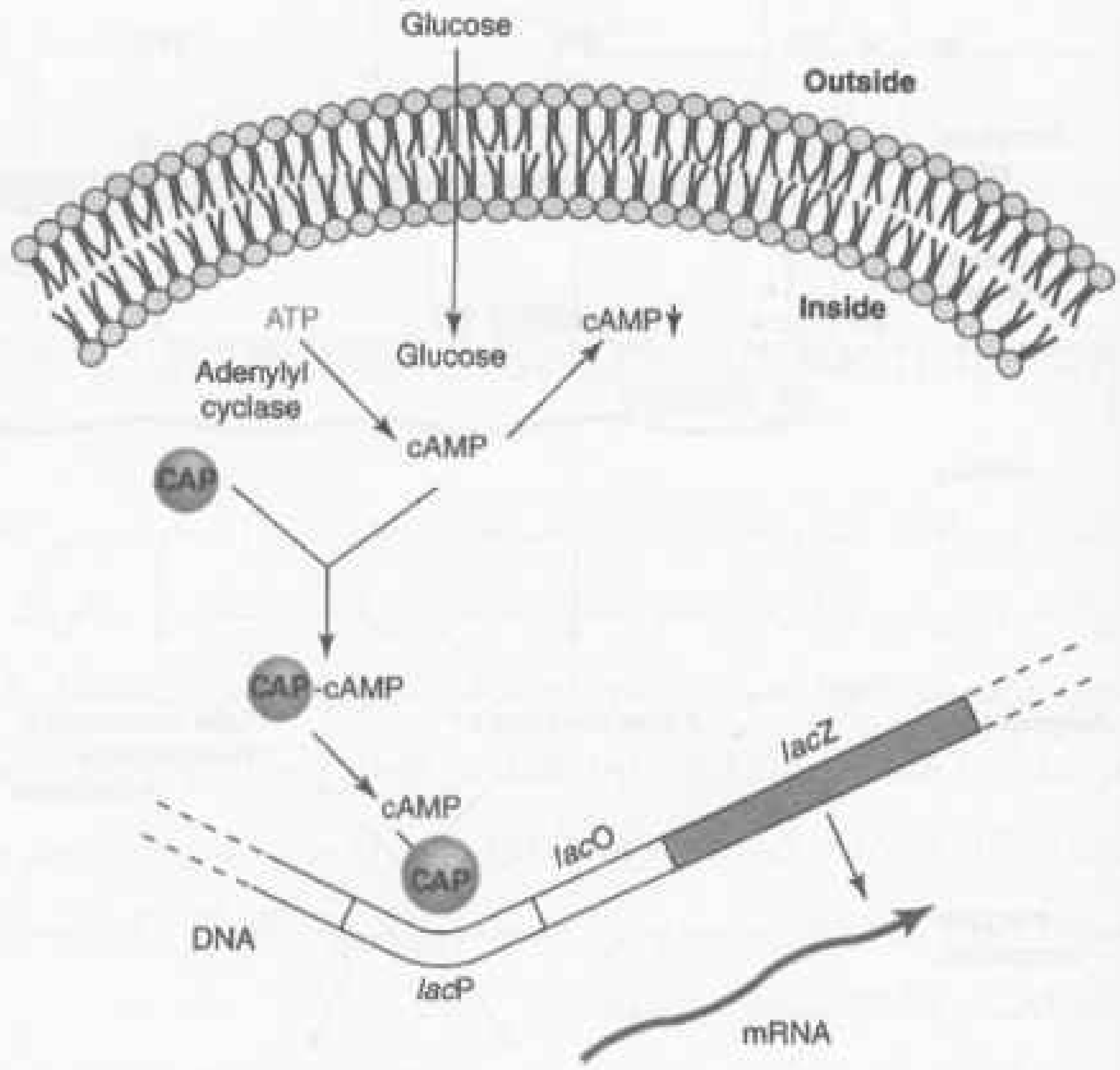


شکل ۵-۸ **کاهش سنتز β-گالاکتوزیداز در حضور گلوکز.** باکتری‌ها در محیطی کشت می‌شوند که در ابتدا حاوی ۰/۴ mg/mL گلوکز و ۲mg/mL لاکتوز می‌باشد. در محور سمت چپ چگالی نوری کشت در حال رشد را نشان می‌دهد که معیاری از تعداد باکتری‌ها است. محور سمت راست میزان واحد β-گالاکتوزیداز در هر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. توجه داشته باشید که ظهور β-گالاکتوزیداز با تأخیر و بعد از اتمام گلوکز صورت می‌گیرد.

سرکوب کاتابولیتی به این دلیل رخ می‌دهد که گلوکز سبب مهار آدنیلات سیکلاز می‌شود که مسئول سنتز **AMP حلقوی (cAMP)** است؛ نتیجه کاهش غلظت داخل‌سلولی cAMP می‌باشد. cAMP کمپلکسی را با **پروتئین فعال‌کننده کاتابولیتی (CAP)** ایجاد می‌کند که بعداً به جایگاه تنظیمی CAP موجود در پروموتر اپرون لاکتوز (و اپرون‌های دیگر) اتصال می‌یابد (شکل ۶-۸). کمپلکس CAP-cAMP از طریق ایجاد یک خمیدگی حدود ۹۰° در مارپیچ DNA، یک اثر کنترلی مثبت بر رونویسی اِعمال می‌کند. در صورتی‌که جایگاه CAP اشغال نشده باشد، RNA پلیمراز به سختی به پروموتر متصل می‌شود و شروع رونویسی کارایی بسیار کمتری دارد.

اپرون لاکتوز نشان می‌دهد که باکتری‌ها به چه شکلی می‌توانند یک پاسخ عمومی را نسبت به شرایط متابولیکی (نیاز به استفاده از گلوکز به‌عنوان منبع انرژی یا کربن) و یک پاسخ اختصاصی به آن شرایط (نیاز به مصرف لاکتوز به‌عنوان قند) را هماهنگ کنند.

1. Catabolite repression



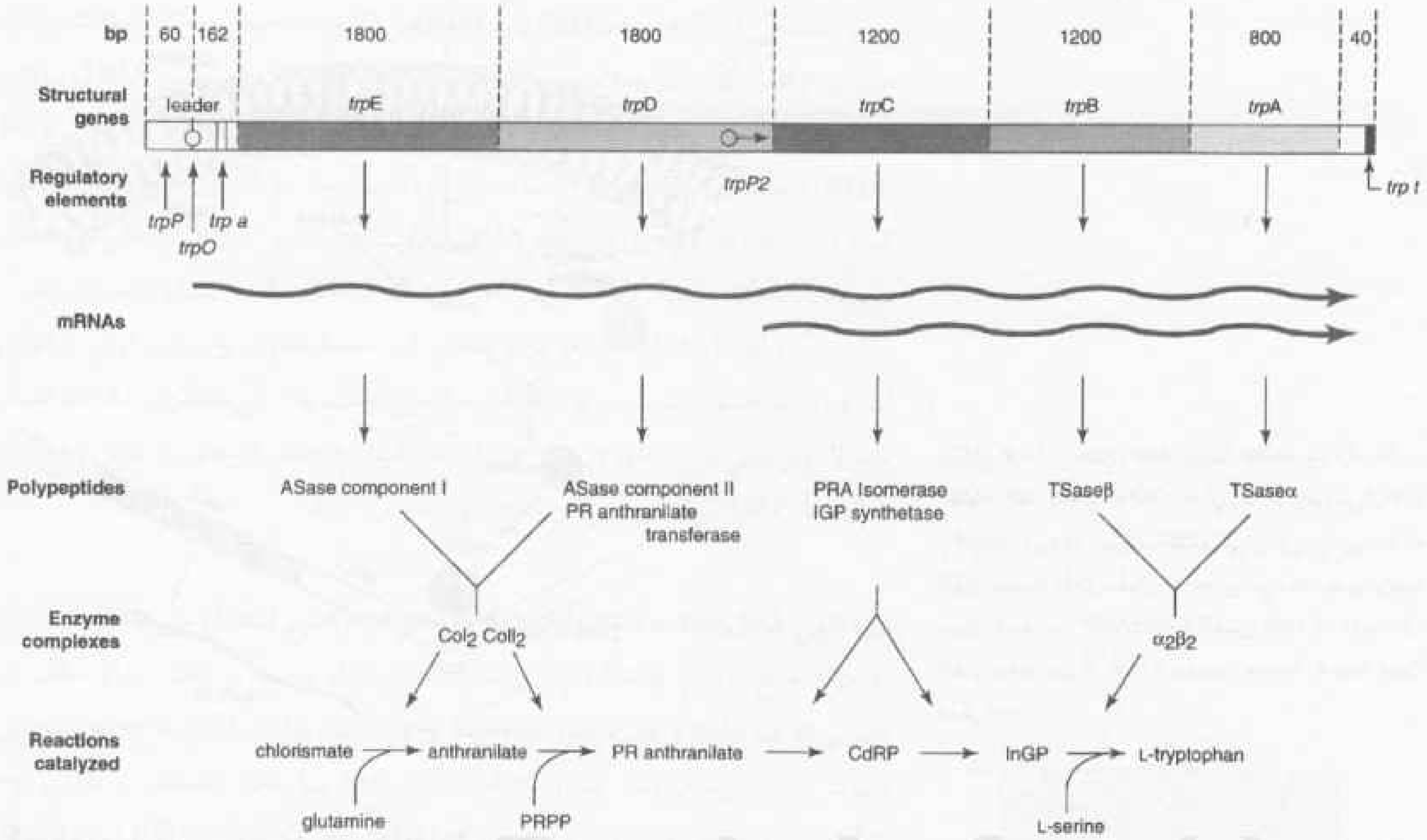
شکل ۶-۸ کنترل *lacP* توسط cAMP. یک کمپلکس CAP- cAMP به جایگاه CAP اتصال یافته و رونویسی از *lacP* را افزایش می‌دهد. سرکوب کاتابولیتی زمانی رخ می‌دهد که گلوکز غلظت داخل‌سلولی را کاهش می‌دهد. بدین‌ترتیب میزان کمپلکس CAP-cAMP کاهش یافته که نتیجه آن کاهش رونویسی از *lacP* و پروموتر مربوط به چند اپرون دیگر است.

۴-۸ • اپرون تریپتوفان در *E.coli*

باکتری‌ها می‌بایست مقادیر مناسب و تعادل نسبی از ۲۰ اسید آمینه مورد نیاز برای سنتز پروتئین‌ها را داشته باشند. برای مثال، **تریپتوفان** برای سنتز تمامی پروتئین‌هایی مورد نیاز است که آن را دارند. لذا در صورتی‌که تریپتوفان به‌میزان کافی در محیط وجود نداشته باشد، سلول باکتری می‌بایست آن را بسازد. برعکس، لاکتوز برای رشد سلول کاملاً ضروری نیست؛ بسیاری از قندهای دیگر می‌توانند جایگزین آن شوند. در نتیجه، سنتز آنزیم‌های بیوسنتتیک تریپتوفان متفاوت از سنتز پروتئین‌های کدشونده توسط اپرون لاکتوز، تنظیم می‌گردد.

اپرون تریپتوفان تحت کنترل یک پروتئین سرکوبگر قرار دارد

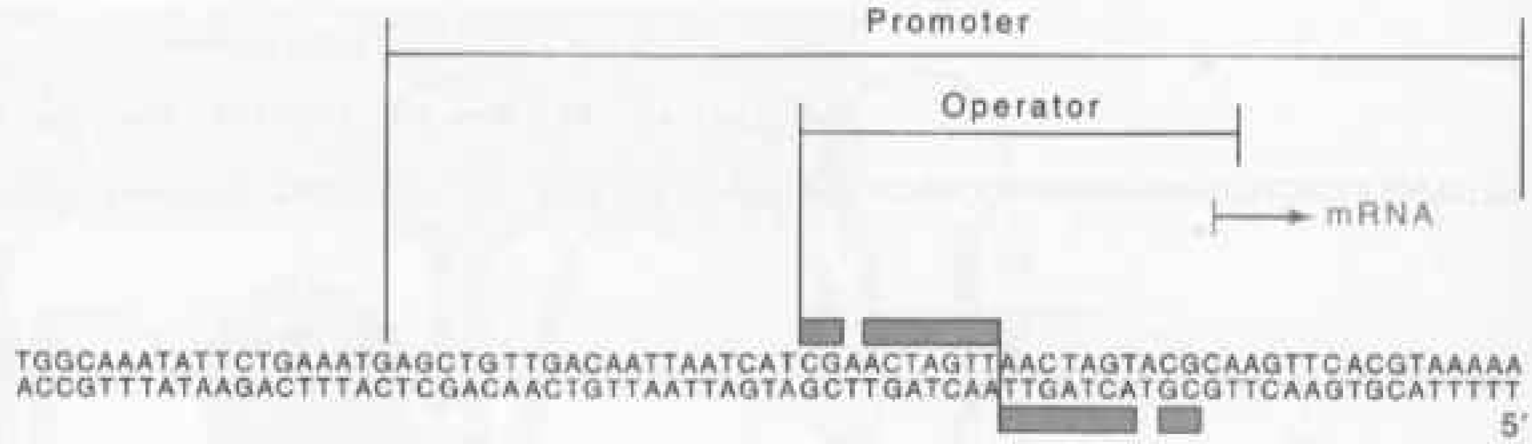
اپرون تریپتوفان طی یک مسیر پنج مرحله‌ای با همکاری سه آنزیم از اسید کوریسمیک سنتز می‌شود (شکل ۷-۸). **اپرون تریپتوفان** حاوی پنج ژن ساختمانی است که این سه آنزیم را کد می‌کنند (دو آنزیم حاوی دو زیرواحد متفاوت هستند). فرادست این دسته ژنی، پروموتری به‌عنوان محل شروع رونویسی و اپراتوری برای اتصال پروتئین سرکوبگر کدشونده توسط یک ژن *trp*R مجزا قرار دارد. رونویسی اپرون لاکتوز عموماً خاموش یا سرکوب می‌باشد، مگر این که توسط یک ملکول القاءکننده کوچک القاء شود. از طرف دیگر، اپرون تریپتوفان همیشه فعال یا سرکوب‌نشده است، مگر آن که توسط ملکول کمک سرکوبگر کوچک سرکوب شود که در مورد اپرون تریپتوفان خود تریپتوفان است.



شکل ۷-۸ ژن‌های مربوط به اپرون تریپتوفان E.coli. عناصر تنظیمی شامل پروموتر اولیه (trpP)، تضعیف‌کننده (trp)، اپراتور (trpO)، تضعیف‌کننده (trpa)، پروموتر داخلی ثانویه (trpP2) و خاتمه‌دهنده (trpt) می‌باشند. جهت سنتز mRNA با پیکان‌های مواج به نشانه ملکول‌های mRNA نشان داده شده‌اند. CoI_2 و $CoII_2$ به ترتیب اجزاء I و II کمپلکس آنترانیلات سنتتاز (ASase) را نشان می‌دهند؛ PR- آنترانیلات عبارتست از N-‎5'- فسفوریبوزیل- آنترانیلات؛ CdRP عبارتست از ۱-(O-کربوکسیل-فنیل‌آمینو)-۱-داکسی‌ریبولوز ۵-فسفات؛ InGP عبارتست از اندول-۳-گلیسرول فسفات؛ PRPP عبارتست از ۵-فسفوریبوزیل-۱-پیروفسفات؛ و TSase عبارتست از تریپتوفان سنتتاز.

بیوسنتز تریپتوفان توسط سنتز و فعالیت آنزیم‌های کاتالیزکننده مسیر تنظیم می‌گردد. برای مثال، آنترانیلات سنتتاز که اولین مرحله را کاتالیز می‌کند، دو زیرواحد دارد که توسط *trp*E و *trp*D کد می‌گردند و فعالیت آنزیمی آن به طریق **مهار پس‌نوردی** تنظیم می‌شود. این راه معمول کوتاه- مدت تنظیم اولین مرحله متعهدکننده در یک مسیر متابولیکی است. تریپتوفان می‌تواند به یک جایگاه آلوستریک بر روی آنترانیلات سنتتاز اتصال یافته و فعالیت آنزیمی آن را مهار کند. بنابراین، وقتی غلظت تریپتوفان زیاد می‌شود، آنترانیلات سنتتاز را مهار می‌کند. تریپتوفان همچنین کمک‌سرکوبگری است که رونویسی اپرون تریپتوفان را خاموش می‌کند. مهار پس‌نوردی یک کنترل کوتاه- مدت با یک اثر فوری بر مسیر است، در حالی که سرکوب زمان بیشتری طول می‌کشد، ولی تأثیر بیشتری برای سرکوب رونویسی دارد.

سرکوبگر تریپتوفان یک هُمودیمر است که هر کدام از زیرواحدهای آن ۱۰۸ اسید آمینه دارند. این سرکوبگر می‌بایست با دو ملکول تریپتوفان ایجاد کمپلکس کرده تا به اپراتور اتصال یابد. بیاد دارید که سرکوبگر لاکتوز تنها در غیاب القاءکننده خود به اپراتور



شکل ۸-۸ **توالی نوکلئوتیدی عناصر کنترلی اپرون تریپتوفان**. کادرهای موجود در بالا و پایین توالی اشاره به توالی‌های متقارن موجود در داخل اپراتور دارند.

اتصال می‌یافت. سرکوبگر تریپتوفان همچنین رونویسی ژن خود، یعنی ***trp*R**، را تنظیم می‌کند. وقتی تریپتوفان در داخل سلول تجمع می‌یابد، کمپلکس سرکوبگر - تریپتوفان به ناحیه فرادست ***trp*R** اتصال یافته و با خاموش‌سازی رونویسی آن، تعادل ۲۰ سرکوبگر در هر سلول را حفظ می‌کند. اپراتور ***trp*** کاملاً در داخل پروموتر ***trp***، به‌جای مجاور آن، قرار دارد (شکل ۸-۸). اپراتور ناحیه‌ای با تقارن دوطرفه می‌باشد و مکانیسم مهار رونویسی همانند اپرون لاکتوز می‌باشد؛ یعنی، اتصال کمپلکس سرکوبگر-کمک‌سرکوبگر به اپراتور مانع اتصال **RNA** پلیمراز می‌شود.

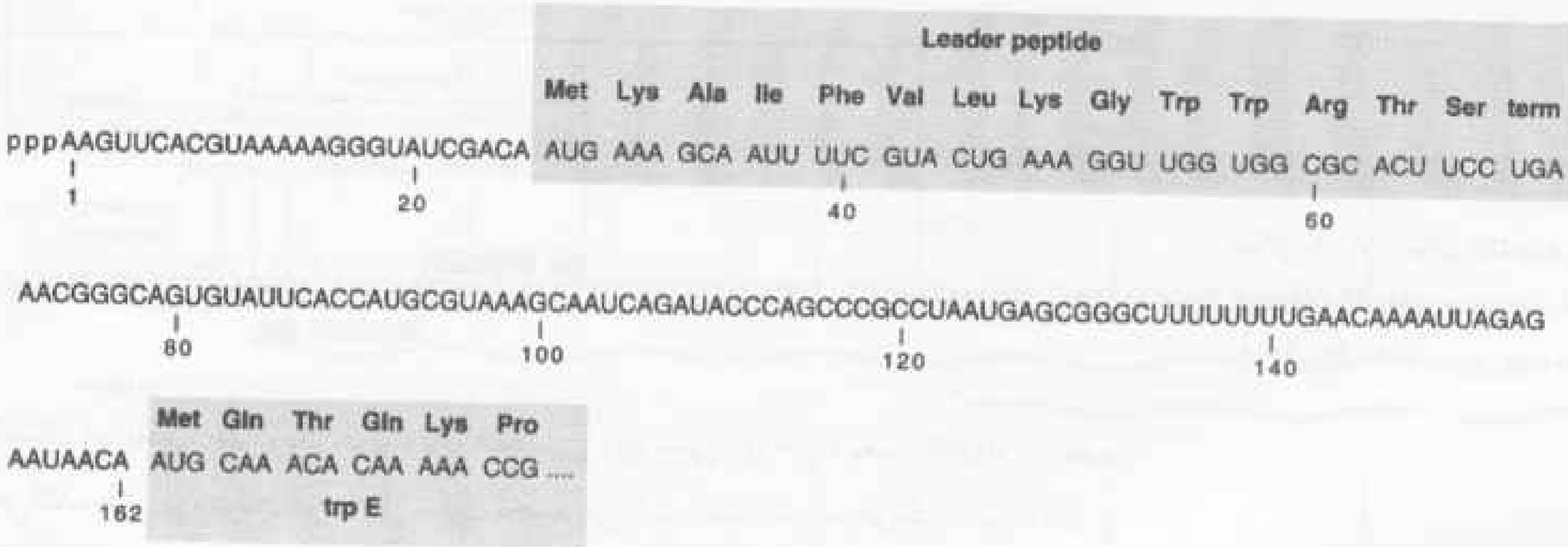
سرکوب سرعت شروع رونویسی از پروموتر ***trp*** را حدود ۸۰ برابر کاهش می‌دهد (میزان پایه محصولات ژن اپرون لاکتوز حدوداً ۱۰۰۰ برابر کمتر از میزان القاءشده می‌باشد). هر چند، اپرون تریپتوفان عناصر تنظیمی دیگری نیز دارد. یک پروموتر ثانویه که به‌صورت ***trp*P2** نمایش داده می‌شود، در داخل توالی کدکننده ***trp*D** وجود دارد (شکل ۷-۸) و توسط سرکوبگر تریپتوفان تنظیم نمی‌شود. رونویسی از این پروموتر به‌طور دائمی با یک سرعت نسبتاً پایین انجام شده تا تولید یک **mRNA** حاوی توالی‌های کدکننده برای ***trp*CBA** کند. لذا از اپرون تریپتوفان، دو ملکول **mRNA** پلی‌سیسترونی تولید می‌شود که یکی حاوی تمامی ژن‌های ساختمانی است و دیگری تنها سه ژن آخر را دارد.

ممکن است نیاز به یک پروموتر داخلی دوم باشد، زیرا سه مورد از این پنج ژن فاقد کدون تریپتوفان هستند؛ تنها ***trp*B** و ***trp*C** کدون تریپتوفان دارند. لذا تحت شرایط کمبود شدید تریپتوفان، این دو پروتئین سنتز نشده که مانع فعال‌سازی مسیر می‌گردد. هرچند، از آنجایی‌که هر دوی این ژن‌ها در فرودست پروموتر دوم تنظیم‌نشده قرار دارند، محصولات پروتئینی آنها همیشه با میزان پایه مورد نیاز برای حفظ مسیر وجود خواهند داشت.

ناحیه تضعیف‌کننده اپرون تریپتوفان

عنصر کنترلی مهم دیگر در اپرون تریپتوفان که در اپرون لاکتوز وجود ندارد، ناحیه **تضعیف‌کننده**[1] می‌باشد (شکل ۹-۸) که در داخل ۱۶۲ نوکلئوتید بین پروموتر و کدون متیونین شروع‌کننده ***trp*E** قرار دارد. وجود این ناحیه برای اولین بار براساس جهش‌هایی استنتاج شد که در این ناحیه نقشه‌برداری شدند و رونویسی تمامی پنج ژن را افزایش دادند. در داخل

1. Attenuator



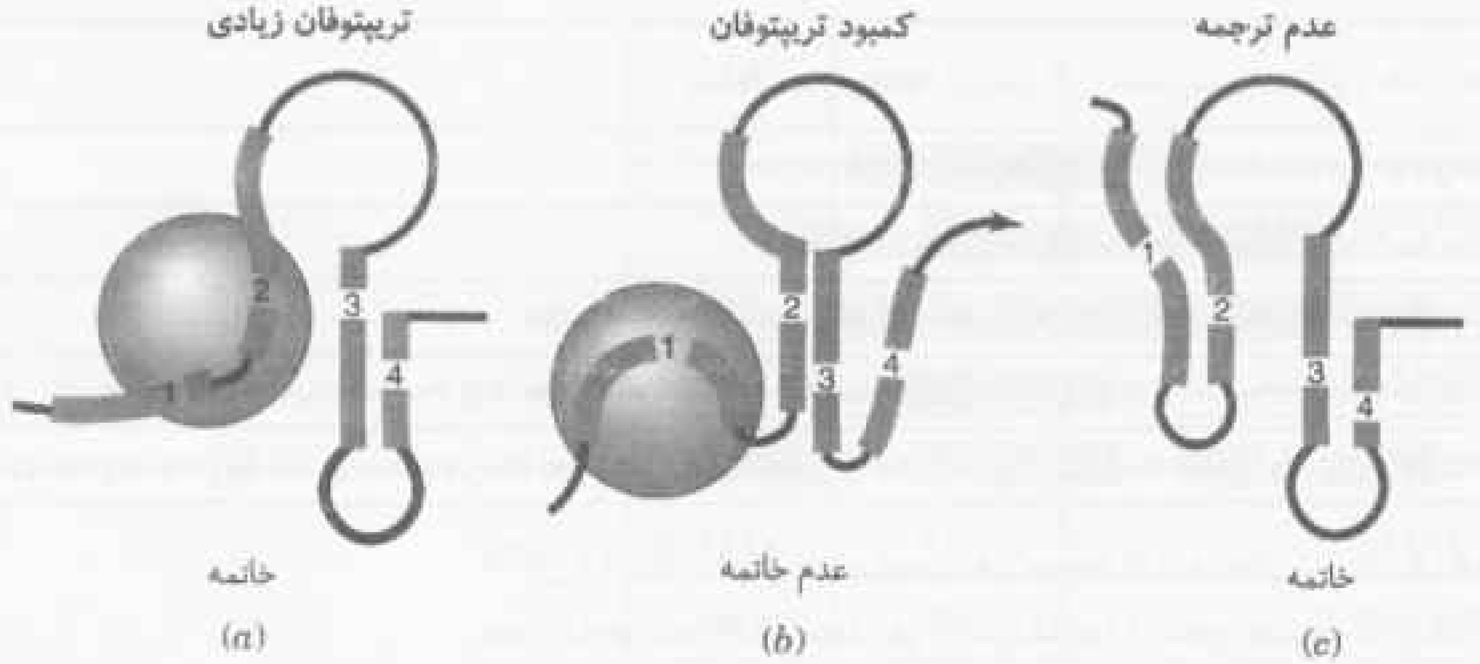
شکل ۹-۸ **توالی نوکلئوتیدی RNA رهبر از اپرون تریپتوفان.** ۱۴ اسید آمینه پپتید رهبر فرضی در بالای کدون‌های آنها نشان داده شده‌اند.

این ناحیه یک **توالی رهبر** [1] وجود دارد؛ این توالی شامل ۱۴ کدون مجاور بوده که با کدون متیونین شروع و با یک کدون خاتمه در ردیف خاتمه می‌یابد. قبل از این کدون‌ها، یک جایگاه اتصال به ریبوزوم رسمی وجود دارد و پتانسیل هدایت تولید یک پپتید رهبر ۱۴ اسید آمینه‌ای را دارد. این پپتید در سلول‌های باکتری یافت نشده است، زیرا به سرعت تخریب می‌شود.

ناحیه تضعیف‌کننده شانس دیگری را برای تنظیم رونویسی اپرون تریپتوفان توسط RNA پلیمراز فراهم می‌کند. در حضور تریپتوفان، رونویسی در پروموتر آغاز می‌شود، ولی به‌طور نارس در انتهای ناحیه تضعیف‌کننده خاتمه می‌یابد. نتیجه تولید یک رونوشت ۱۴۰ نوکلئوتیدی است. در غیاب تریپتوفان، ناحیه تضعیف‌کننده اثری بر روی رونویسی ندارد و کل mRNA **پلی‌سیسترونی** با پنج ژن ساختمانی سنتز می‌گردد. لذا هم در محل اپراتور و هم در محل تضعیف‌کننده، تریپتوفان اثر کلی یکسانی دارد. در محل اپراتور، تریپتوفان در سرکوب رونویسی همکاری می‌کند و در محل تضعیف‌کننده سبب خاتمه رونویسی توسط RNA پلیمرازهایی می‌شود که از سرکوب فرار کرده‌اند. تضعیف یک اثر ۱۰ برابر بر روی رونویسی ژن‌های ساختمانی تریپتوفان دارد. سرکوب‌زدایی در اپراتور یک اثر ۸۰ برابر دارد، لذا رونویسی اپرون تریپتوفان در یک دامنه ۸۰۰ برابر تنظیم می‌شود.

رونویسی در جایگاه تضعیف‌کننده به‌واسطه تعامل بین رونویسی و ترجمه خاتمه می‌یابد. توالی رهبر تریپتوفان دو کدون مجاور تریپتوفان در موقعیت‌های ۱۰ و ۱۱ دارد (شکل ۹-۸). این حالت غیرمعمول است، زیرا تریپتوفان اسید آمینه نادری در *E.coli* است. این کدون‌ها دلیل ابتدایی نقش $tRNA^{trp}$ در تضعیف را فراهم کردند. در صورتی‌که تریپتوفان سلول پایین باشد، میزان تریپتوفانیل - $tRNA^{trp}$ شارژشده نیز پایین خواهد بود. لذا ریبوزوم قادر به ترجمه دو کدون تریپتوفان نبوده و در توالی RNA رهبر متوقف می‌ماند.

1. Leader sequence



شکل ۸-۱۰ مدل شماتیک برای تضعیف در اپرون E.coli. (a) تحت شرایط تریپتوفان زیادی، ریبوزوم (ساختمان کروی) RNA رهبری را که تازه رونویسی شده است را ترجمه کرده و تولید پپتید رهبر کامل می‌کند. طی این سنتز، ریبوزوم به نواحی ۱ و RNA۲ اتصال یافته و مانع تشکیل ساقه و قوس ۲-۱ یا ۳-۲ می‌شود. لذا ساقه و قوس ۴-۳ تشکیل شده که خاتمه رونویسی را به ملکول RNA پلیمراز علامت می‌دهد (نشان داده نشده است). (b) تحت شرایط کمبود تریپتوفان، میزان تریپتوفانیل - $tRNA^{Trp}$ محدود بوده و ریبوزوم در مجاورت کدون‌های تریپتوفان در ابتدای ناحیه ۱ ناحیه‌کدکننده پپتید رهبر متوقف می‌شود. از آنجایی‌که ناحیه ۱ به ریبوزوم‌ها متصل است، ساقه و قوس ۳-۲ تشکیل خواهد شد که نتیجه آن عدم تشکیل ساقه و قوس ۴-۳ مورد نیاز برای تضعیف رونویسی است. لذا RNA پلیمراز رونویسی را به داخل ژن‌های ساختمانی ادامه می‌دهد. (c) تحت شرایطی که در آنها پپتید رهبر ترجمه نمی‌شود، ساقه و قوص ۲-۱ ایجاد شده و مانع تشکیل ساقه و قوس ۳-۲ شده و امکان تشکیل ساقه و قوس ۴-۳ را فراهم می‌سازد. این موضوع سبب خاتمه رونویسی می‌شود.

توالی RNA ناحیه تضعیف‌کننده می‌تواند چندین ساختمان ثانویه را اتخاذ کند (شکل ۸-۱۰). موقعیت ریبوزوم بر روی توالی رهبر تعیین می‌کند که کدام یک از این ساختمان‌ها به وجود آیند. به نوبه خود، این ساختمان دوم توسط RNA پلیمراز شناسایی می‌شود که این ناحیه را رونویسی کرده است. ساختمانی که در هنگام عدم توقف ریبوزوم در کدون‌های تریپتوفان حاصل می‌شود، یک پیام خاتمه برای RNA پلیمراز است و بدین ترتیب رونویسی بعد از سنتز یک رونوشت ۱۴۰ نوکلئوتیدی متوقف شده و این رونوشت سریعاً تخریب می‌گردد. ساختمان دومی که در هنگام توقف ریبوزوم‌ها در کدون‌های تریپتوفان حاصل می‌شود، به عنوان پیام خاتمه در نظر گرفته نشده و رونویسی به داخل ژن *trpE* ادامه می‌یابد.

سایر اپرون‌های مربوط به بیوسنتز اسیدهای آمینه به طریق تضعیف رونویسی کنترل می‌شوند

تضعیف رونویسی در موجودات اوکاریوتی رخ نمی‌دهد، زیرا رونویسی (در هسته) و ترجمه (در سیتوپلاسم) در بخش‌های سلولی متفاوتی انجام می‌شوند. هر چند، تضعیف در بیان ژن باکتریایی معمول است و در حداقل شش اپرون دیگر برای آنزیم‌های کاتالیزکننده مسیرهای بیوسنتتیک اسیدهای آمینه رخ می‌دهد. شکل ۸-۱۱ توالی‌های پپتید رهبر مربوط به این اپرون‌ها را نشان می‌دهد. در هر مورد، **پپتید رهبر** چندین ریشه از اسید آمینه‌ای را دارد که محصول نهایی مسیر مربوط است. پپتید رهبر ۱۶ اسید آمینه‌ای که توسط اپرون هیستیدین کد می‌شود، هفت ریشه هیستیدین مجاور دارد. کمبود هیستیدین منجر به‌کاهش میزان

اسیدهای آمینه تنظیمی	توالی پپتید رهبر	اپرون
His	Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp	*his*
Phe	Met-Lys-His-Ile-Pro-Phe-Phe-Phe-Ala-Phe-Phe-Phe-Thr-Phe-Pro	*pheA*
Thr Ile	Met-Lys-Arg-Ile-Ser-Thr-Thr-Ile-Thr-Thr-Thr-Ile-Thr-Ile-Thr-Thr-Gly-Asn-Gly-Ala-Gly	*thr*
Leu	Met-Ser-His-Ile-Val-Arg-Phe-Thr-Gly-Leu-Leu-Leu-Leu-Asn-Ala-Phe-Ile-Val-Arg-Gly-Arg-Pro-Val-Gly-Gly-Ile-Gln-His	*leu*
Leu, Val, Ile	Met-Thr-Ala-Leu-Leu-Arg-Val-Ile-Ser-Leu-Val-Val-Ile-Ser-Val-Val-Val-Ile-Ile-Ile-Pro-Pro-Cys-Gly-Ala-Ala-Leu-Gly-Arg-Gly-Lys-Ala	*ilv*

شکل ۱۱-۸ **توالی‌های پپتیدی رهبر مربوط به اپرون‌های بیوسنتتیک *E.coli*.** تمامی توالی‌های پپتیدی رهبر حاوی نسخه‌های متعددی از اسید(های) آمینه‌ای هستند که توسط آنزیم‌های کدشونده توسط آن اپرون سنتز می‌شوند.

هیستیدیل $tRNA^{his}$ و افزایش رونویسی اپرون *his* می‌گردد. توالی نوکلئوتیدی ناحیه تضعیف-کننده نشان می‌دهد که توقف ریبوزوم در این کدون‌ها بر روی تشکیل قوس‌های سنجاقی دیگر تأثیر می‌گذارد که یکی از آنها مشابه سنجاق خاتمه است که بعد از آن ریشه‌های U وجود دارد. برخلاف اپرون *trp*، رونویسی اپرون *his* عمدتاً با مکانیسم تضعیف تنظیم می‌شود، زیرا فاقد اپراتوری است که توسط یک سرکوبگر شناسایی شود. در عوض، ریبوزوم تقریباً همانند یک پروتئین تنظیم‌کننده مثبت، مشابه کمپلکس cAMP-CAP در اپرون *lac* عمل می‌کند. در صورت اتصال ریبوزوم به (یعنی، توقف آن بر روی) جایگاه تضعیف‌کننده، رونویسی ژن‌های ساختمانی فرودست تسریع می‌شود. در صورت عدم اتصال ریبوزوم، رونویسی این ژن‌ها به میزان زیادی کاهش می‌یابد.

همان‌طور که در شکل ۱۱-۸ نشان داده شده است، رونویسی برخی اپرون‌ها را می‌توان با بیش از یک اسید آمینه تضعیف کرد. برای مثال، اپرون *thr* توسط ترئونین یا ایزولوسین و اپرون *ilv* توسط لوسین، والین و ایزولوسین تضعیف می‌شود. این اثر را می‌توان در هر مورد با توقف ریبوزوم در کدون مربوطه توجیه نمود که با تولید سنجاق خاتمه تداخل می‌کند. در توالی‌های رهبر بلندتر، برای رسیدن به رونویسی حداکثر از طریق ناحیه تضعیف، ممکن است نیاز به توقف در بیش از یک کدون وجود داشته باشد.

۵-۸ • سایر اپرون‌های باکتریایی

سنتز پروتئین‌های ریبوزومی به طریق هماهنگ تنظیم می‌شود

بسیاری از اوپرون‌های باکتریایی از مکانیسم‌های تنظیمی عمومی مشابه انواع موجود در اپرون‌های *lac* ،*trp* و *his* استفاده می‌کنند. هر چند، هر اپرون خصوصیات متفاوت خود را دارد. یکی از مثال‌ها در خصوص ژن‌های ساختمانی مربوط به حداقل ۷۰ پروتئینی است که یک ریبوزوم را تشکیل می‌دهند (شکل ۱۲-۸). هر ریبوزوم یک نسخه از هر **پروتئین ریبوزومی** را دارد (به غیر از پروتئین L7-L12 که احتمالاً با چهار نسخه وجود دارد). لذا

اپرون	پروتئین تنظیمی	پروتئین‌هایی که توسط اپرون تعیین می‌شوند
Spc	S8	L14-L24-L5-S14-S8-L6-L18-S5-L15-L30
S10	L4	S10-L3-L2-L4-L23-S19-L22-S3-S17-L16-L29
str	S7	S12-S7-EF.G-EF.Tu
α	S4	S13-S11-S4-α-L17
L11	L1	L11-L1
rif	L10	L10-L7-β-β′

شکل ۱۲-۸ اپرون‌های حاوی ژن‌هایی برای پروتئین‌های ریبوزومی *E.coli*. ژن‌های مربوط به اجزاء پروتئینی زیرواحدهای کوچک (S) و بزرگ (L) *E.coli* در چندین اپرون دسته شده‌اند. برخی از این اپرون‌ها همچنین حاوی ژن‌هایی برای زیرواحدهای α، β، و β′ آنزیم RNA پلیمراز، و فاکتورهای سنتز پروتئین EF.G و EF.Tu هستند. معمولاً حداقل یک محصول پروتئینی بیان اپرون را تنظیم می‌کند (ص. ۴۱۵).

نیاز به مقادیر برابر تمامی این ۷۰ پروتئین می‌باشد و این موضوع نشان می‌دهد که سنتز آنها به‌طور هماهنگ انجام می‌شود. شش اپرون متفاوت، حاوی حدود نیمی از ژن‌های پروتئین ریبوزومی، به صورت دو دسته ژنی اصلی وجود دارند. یک دسته حاوی چهار اپرون مجاور (*Spc*، *S10*، *str* و *α*) و دیگری حاوی دو اپرون (*L11* و *rif*) در محل متفاوتی از کروموزوم *E.coli* قرار دارند. الگوی واضحی برای توزیع این ژن‌ها در بین این اپرون‌ها وجود ندارد. برخی اپرون‌ها پروتئین‌هایی را برای یک زیرواحد ریبوزومی کد می‌کنند؛ اپرون‌های دیگر پروتئین‌هایی را برای هر دو زیرواحد کد می‌کنند. همچنین این اپرون‌ها حاوی ژن‌هایی برای پروتئین‌های دیگر (تنظیمی) هستند. برای مثال، اپرون *str* شامل ژن‌هایی برای فاکتورهای طویل‌سازی ترجمه محلول، یعنی EF-Tu و EF-G، و ژن‌هایی برای برخی پروتئین‌های موجود در زیرواحد ریبوزومی 30S است. اپرون α ژن‌هایی برای پروتئین‌های مربوط به هر دو زیرواحد ریبوزومی و یک ژن برای زیرواحد α در RNA پلیمراز دارد. اپرون *rif* ژن‌هایی را برای زیرواحدهای β و β' در RNA پلیمراز و پروتئین‌های ریبوزومی دارد.

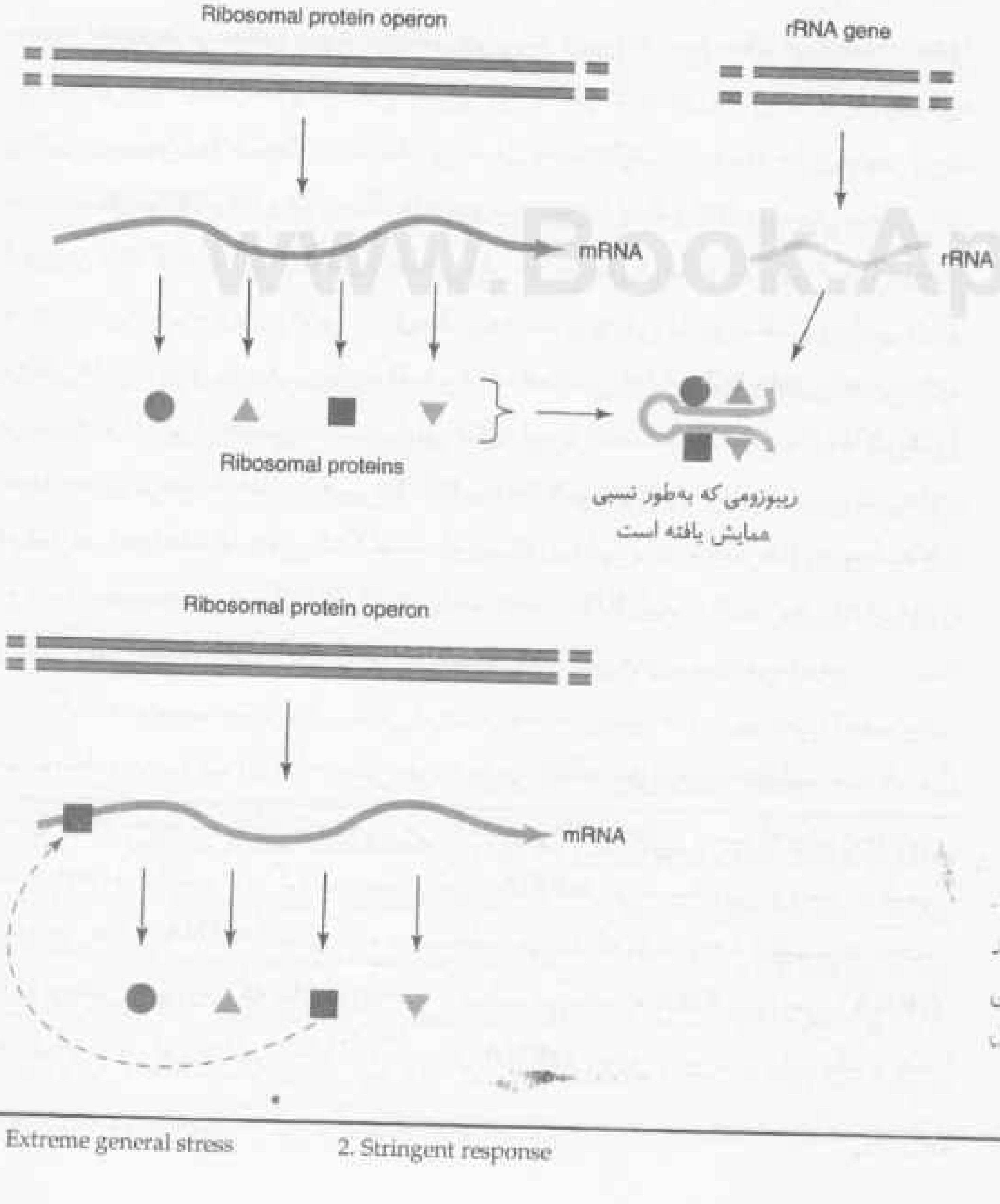
یک خصوصیت مشترک این شش اپرون مربوط به پروتئین‌های ریبوزومی، تنظیم بیان آنها توسط محصولات ژن ساختمانی خود آنها می‌باشد؛ یعنی، **خود-تنظیم**[1] هستند. در برخی موارد، تنظیم در سطح ترجمه رخ می‌دهد که برخلاف حالتی است که برای اپرون‌های *lac* و *trp* مورد اشاره قرار گرفت. بعد از تولید mRNA پلی‌سیسترونی، پروتئین تنظیمی ریبوزومی به این mRNA اتصال یافته و مشخص می‌کند که کدام ناحیه تنظیم شود. به‌طور کلی، پروتئین ریبوزومی که بیان اپرون خود را تنظیم می‌کند، به RNA ریبوزومی (rRNA) اتصال می‌یابد. این پروتئین تمایل بالایی برای rRNA و تمایل پایین‌تری برای یک یا چند

1. Self-regulated

ناحیه mRNA خود دارد. لذا رقابتی بین rRNA و mRNA اپرون برای اتصال به این پروتئین رخ می‌دهد. وقتی این پروتئین به میزان بیش از rRNA آزاد تجمع می‌یابد، به mRNA خود اتصال یافته و مانع سنتز پروتئین در یک یا چند توالی کدکننده بر روی این mRNA می‌شود (شکل ۱۳-۸). هرچه ریبوزوم بیشتری تولید می‌شود، میزان زیادی این پروتئین مصرف شده و ترجمه mRNA آن دوباره می‌تواند شروع شود.

سنتز ملکول‌های rRNA و tRNA با پاسخ کسادی کنترل می‌شود

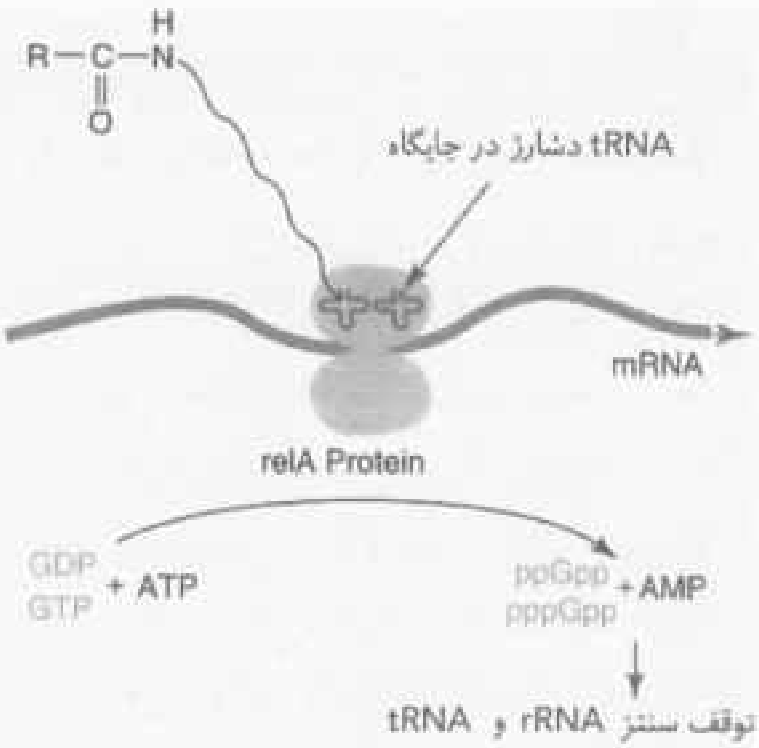
باکتری‌ها به چند طریق به **استرس عمومی شدید**[1] پاسخ می‌دهند. یکی از این حالات زمانی است که اسید آمینه کافی برای حفظ سنتز پروتئین وجود ندارد. تحت این شرایط، سلول **پاسخ کسادی**[2] را فرا می‌خواند که سنتز ملکول‌های rRNA و tRNA را حدود ۲۰ برابر کاهش می‌دهد. سنتز ملکول‌های mRNA نیز حدود ۳ برابر کاهش می‌یابد.



شکل ۱۳-۸ خود-تنظیمی سنتز پروتئین ریبوزومی. در صورتی‌که rRNA آزاد برای همایش زیرواحدهای جدید ریبوزومی در دسترس قرار نداشته باشد، پروتئین‌های ریبوزومی خاصی به mRNA پلی‌سیسترونی مربوط به اپرون خود اتصال یافته و ادامه ترجمه را متوقف می‌سازند.

1. Extreme general stress
2. Stringent response

پاسخ کسادی با حضور یک tRNA شارژنشده در جایگاه A ریبوزوم آغاز می‌شود؛ این حالت زمانی رخ می‌دهد که غلظت tRNA شارژشده مربوطه بسیار پایین باشد. اولین اثر توقف طویل‌سازی پپتید توسط ریبوزوم می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۱۴-۸ نشان داده شده است، این توقف سبب می‌شود تا پروتئینی تحت عنوان فاکتور کسادی که محصول ژن relA است، تولید **گوانوزین تترافسفات (ppGpp)** و **گوانوزین پنتافسفات (pppGpp)** از ATP و GTP یا GDP را انجام دهد. فاکتور کسادی ارتباط سُستی را با برخی ریبوزوم‌های سلول برقرار می‌کند. احتمالاً با حضور یک tRNA شارژنشده در جایگاه A، یک تغییر کونفورماسیونی در ریبوزوم القاء می‌شود که به نوبه خود فاکتور کسادی مربوطه را فعال می‌کند. فعالیت دقیق ppGpp و pppGpp مشخص نیست. هر چند، این ترکیبات با مهار شروع رونویسی ژن‌های rRNA و tRNA، بر روی رونویسی برخی اپرون‌ها بیش از بقیه تأثیر می‌گذارند.



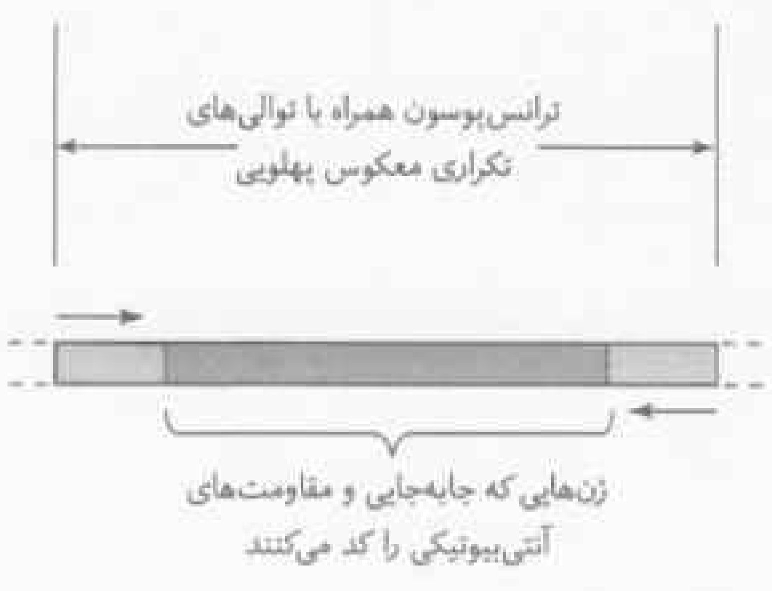
شکل ۱۴-۸ کنترل کسادی سنتز پروتئین در *E.coli*. در هنگام کمبود شدید اسید آمینه، یک tRNA دشارژ در جایگاه A ریبوزومی قرار گرفته و پروتئین relA را برای سنتز ppGpp و pppGpp تحریک می‌کند که در کاهش رونویسی ژن‌های کدکننده ملکول‌های rRNA و tRNA نقش دارند.

۶-۸ • ترانس‌پوسون‌های باکتریایی

ترانس‌پوسون‌ها قطعات متحرک DNA هستند

اکثریت ژن‌های باکتریایی موقعیت‌های ثابتی را در کروموزوم دارند. در حقیقت، نقشه‌های ژنتیکی ***E.coli*** و ***Samonella typhimurium*** بسیار شبیه هستند که عدم جابه‌جایی تکاملی اکثر ژن‌ها در داخل کروموزوم‌های باکتریایی را نشان می‌دهد. هر چند، کلاس کوچکی از ژن‌های باکتریایی وجود دارند که در آنها نسخه‌های ژنی که جدیداً دو برابر شده‌اند، با فراوانی حدود 10^{-7} در هر نسل، از یک موقعیت ژنومی به موقعیت دیگر «می‌پرند». این قطعات متحرک DNA را **عناصر قابل انتقال**[1] یا **ترانس‌پوسون**[2] گویند (شکل ۱۵-۸). برخی ژن‌های موجود در داخل ترانس‌پوسون‌های باکتریایی، وجود و تغییر موقعیت خود ترانسپوسون را کنترل می‌کنند، در حالی‌که موارد دیگر ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک هستند که مزیتی را برای باکتری موردنظر نسبت به سایر باکتری‌ها به‌وجود می‌آورد.

ترانسپوسون‌ها برای اولین بار به‌عنوان الحاق‌های[3] نادر DNA خارجی در داخل ژن‌های ساختمانی اپرون‌های باکتریایی شناسایی شدند. معمولاً این الحاق‌ها با بیان ژن ساختمانی تحت تأثیر و تمامی ژن‌های فرودست آن اپرون تداخل می‌کنند. این موضوع تعجب‌آور نیست، زیرا الحاق‌ها می‌توانند قالب ترجمه-خواندن را تغییر دهند، پیام‌های خاتمه رونویسی را ارائه دهند، بر روی پایداری mRNA تأثیر بگذارند، و غیره. بسیاری از ترانس‌پوسون‌ها و جایگاه‌هایی که در داخل آنها قرار داده می‌شوند، با استفاده از تکنیک‌های DNA نوترکیبی جدا و به‌طور وسیعی شناسایی شده‌اند.



شکل ۱۵-۸ ساختمان عمومی ترانس‌پوسون‌ها. ترانس‌پوسون‌ها قطعات نسبتاً متحرکی از DNA هستند که ژن‌های کدکننده برای نوآرایی خود دارند و اغلب حاوی ژن‌هایی هستند که سبب مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف می‌شوند.

برخی ترانس‌پوسون‌ها متشکل از چندین هزار جفت باز هستند و شامل دو یا سه ژن می‌باشند؛ ترانسپوسون‌های دیگر بسیار بزرگتر بوده و ژن‌های زیادی را دارند. گاهی اوقات،

1. Transposable elements 2. Transposon 3. Insersions

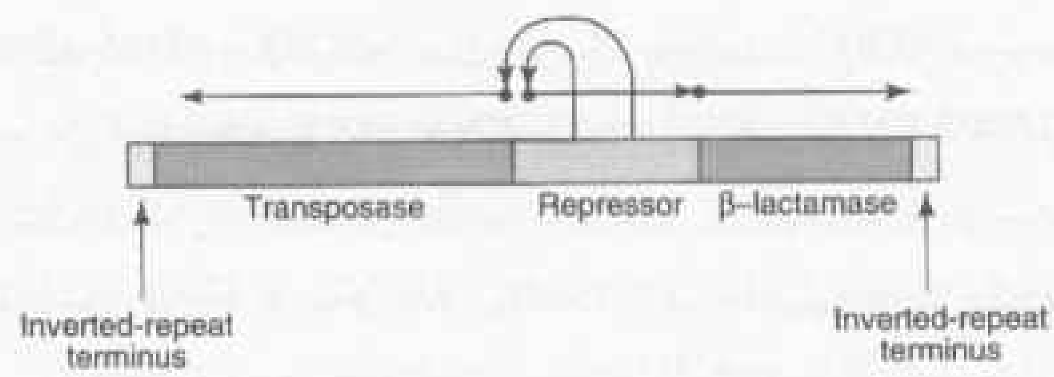
ترانس‌پوسون‌های کوچک می‌توانند در داخل یک ترانس‌پوسون بزرگ وجود داشته باشند. تمامی ترانس‌پوسون‌های فعال متشکل از حداقل یک ژن می‌باشند که یک **ترانسپوساز**[1] را کد می‌کند که خود برای رویداد تغییر موقعیت یا «برش» لازم است. ترانس‌پوسون‌ها اغلب حاوی ژن‌هایی برای مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین هستند. اکثر تغییر موقعیت‌ها مستلزم یک نسخه دیگر از ترانس‌پوسون و قرارگیری این نسخه در موقعیت دیگر می‌باشند. نسخه اصلی تحت تأثیر الحاق نسخه دوم خود در جایگاه هدف جدید قرار نمی‌گیرد. ترانس‌پوسون‌ها حاوی **توالی‌های تکراری انتهایی** معکوس کوتاه هستند که برای مکانیسم الحاق ضروری می‌باشند و اغلب از آنها برای تعیین مرزهای یک ترانس‌پوسون استفاده می‌شود. اکثر جایگاه‌های هدف توالی‌های نسبتاً تصادفی هستند، هر چند برخی ترانس‌پوسون‌ها تمایلی برای الحاق در «نقاط داغ» اختصاصی دارند. ترانس‌پوسون دو برابر شده می‌تواند در ملکول DNA متفاوتی نسبت به DNAدهنده خود قرار گیرد. اغلب ترانسپوسون‌ها در پلاسمیدهایی یافت می‌شوند که از یک سوش باکتریایی به سوش باکتریایی دیگر انتقال می‌یابند و منبع یک مقاومت اکتسابی ناگهانی باکتری نسبت به یک یا چند آنتی‌بیوتیک می‌باشند (ارتباط بالینی ۱-۸ را ببینید).

ترانس‌پوسون *Tn*3 حاوی سه ژن ساختمانی است

ترانس‌پوسون *Tn*3 نمونه‌ای از ترانس‌پوسون‌ها است که حاوی ۴۹۵۷bp از جمله تکرارهای معکوس ۳۸ جفت‌بازی در هر انتها می‌باشد (شکل ۱۶-۸). سه ژن در *Tn*3 وجود دارد. یکی از این ژن‌ها β- لاکتاماز را کد می‌کند که با هیدرولیز آمپی‌سیلین، سبب مقاومت سلول در برابر این آنتی‌بیوتیک می‌شود. ژن‌های دیگر، شامل *tnp*A و *tnp*R به‌ترتیب یک ترانس‌پوساز و یک پروتئین سرکوبگر را کد می‌کنند. ترانس‌پوساز حاوی ۱۰۲۱ اسید آمینه است و به DNA تک رشته اتصال می‌یابد. این آنزیم دو انتهای تکراری ترانس‌پوسون را شناسایی نموده و در شکست جایگاه هدفی همکاری دارد که نسخه جدید ترانس‌پوسون در داخل آن قرار داده می‌شود. پروتئین سرکوبگر ۱۸۵ اسید آمینه‌ای، رونویسی ژن خود و همچنین ژن ترانس‌پوساز را کنترل می‌کند. *tnp*A و *tnp*R به‌صورت واگرا از یک ناحیه کنترلی ۱۶۳ جفت‌بازی رونویسی می‌شوند که بین آنها قرار گرفته و سرکوبگر به آن اتصال می‌یابد. این سرکوبگر همچنین در الحاق ترانس‌پوسون جدید دخالت دارد، ولی بر روی رونویسی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین تأثیری ندارد.

جهش‌های *tnp*A که ترانس‌پوساز را غیرفعال می‌کنند، فراوانی تغییر موقعیت *Tn*3 را کاهش می‌دهند. جهش‌های *tnp*R که سرکوبگر را غیرفعال می‌کنند، سبب افزایش فراوانی تغییر موقعیت می‌شوند. این جهش‌ها منجر به سرکوب‌زدایی *tnp*A شده که نتیجه آن افزایش تعداد ملکول‌های ترانس‌پوساز می‌باشد که خود تولید نسخه‌های دوبرابرشده ترانس‌پوسون

1. Transposase



شکل ۱۶-۸ **اجزاء وظیفه‌دار ترانس‌پوسون *Tn3*.** آنالیزهای ژنتیکی و توالی DNA نشان می‌دهند که چهار ناحیه مجزا وجود دارد: دو انتهای تکراری معکوس ۳۸ جفت‌بازی؛ یک ژن برای آنزیم β- لاکتاماز که سبب مقاومت در برابر آمپی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های مربوطه می‌شود؛ یک ژن کدکننده آنزیم مورد نیاز برای جابه‌جایی (ترانس‌پوساز)، و یک ژن برای یک پروتئین سرکوبگری که رونویسی ژن‌ها برای ترانس‌پوساز و خود سرکوبگر را کنترل می‌کند. پیکان‌های افقی جهت رونویسی را نشان می‌دهند.

را افزایش می‌دهد. این جهش‌ها همچنین *tnpR* را سرکوب‌زدایی کرده، ولی به دلیل غیرفعال‌بودن سرکوبگر، این سرکوب‌زدایی اثری ندارد.

اهمیت ترانس‌پوسون‌هایی که در پلاسمیدهای باکتریایی قرار دارند، در استفاده بالینی آنتی‌بیوتیک‌ها در حال افزایش است. پلاسمیدهای باکتریایی که برای استفاده تجربی تغییر داده نشده‌اند، معمولاً حاوی ژن‌هایی هستند که انتقال آنها از یک باکتری به باکتری دیگر را تسهیل می‌کنند. وقتی این پلاسمیدها میان سوش‌های باکتریایی عفونت‌زای مختلف انتقال داده شوند، ترانس‌پوسون‌های حاوی **ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک** به داخل سوش‌های باکتریایی جدید وارد می‌شوند. وقتی در داخل باکتری جدید قرار دارند، ترانس‌پوسون می‌تواند دوبرابر و وارد کروموزوم شده و برای همیشه در آن رده سلولی باقی بماند. نتیجه این خواهد بود که سوش‌های باکتریایی بیماریزا نسبت به تعداد رو به افزایشی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌تر و مقاوم‌تر می‌شوند (ارتباط بالینی ۲-۸).

۷-۸ • بیان ژن در اوکاریوت‌ها

برای پاسخ‌دهی مناسب به نیازهای بیولوژیکی، رونویسی ژن در ارگانیسم‌های اوکاریوتی نیز تحت تنظیم قرار دارد. علاوه‌بر تعدیل بیان ژن در پاسخ به شرایط تغذیه‌ای و محیطی، ارگانیسم‌های چندسلولی بیان ژن‌های تخصص‌یافته‌ای را تنظیم می‌کنند که سبب تمایز سلولی و تعیین نوع سلول اختصاصی می‌شود. برخی ژن‌ها که تحت عنوان ژن‌های خانه‌دار[1] مورد اشاره قرار می‌گیرند، در اکثر سلول‌ها بیان می‌شوند، ژن‌های دیگر برحسب درخواست فعال می‌شوند و ژن‌هایی نیز در چند نوع از سلول‌ها در کل برای همیشه غیرفعال هستند. در سلول‌های اوکاریوتی، غشاء هسته به‌عنوان سدی عمل می‌کند که به‌طور انتخابی اجازه دسترسی برخی پروتئین‌ها به DNA را می‌دهد، در حالی که پروتئین‌های دیگر را در داخل سیتوزول نگه می‌دارند. در باکتری‌ها یک RNA پلیمراز مسئول رونویسی تمامی ملکول‌های

ارتباط بالینی ۱-۸

مقاومت دارویی- متعدد قابل انتقال

افزایش مقاومت باکتری‌های بیماریزا نسبت به تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها، یک زنگ خطر است. موارد متعدد مستند شده‌ای وجود دارند که در آنها یک سوش باکتریایی در بیمار تحت درمان با یک آنتی‌بیوتیک، ناگهان نسبت به آن آنتی‌بیوتیک و به‌طور همزمان نسبت به چندین آنتی‌بیوتیک دیگری که تاکنون حتی آن سوش باکتریایی با آنها مواجه نشده است، مقاوم می‌گردد. این حالت زمانی رخ می‌دهد که یک باکتری به‌صورت ناگهانی پلاسمیدی را از سوش باکتریایی دیگری دریافت می‌کند که حاوی چندین ترانس‌پوسون مختلف می‌باشد که هر کدام از آنها یک یا چند ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را دارند. نمونه‌هایی از اینها عبارتند از ژن‌های کدکننده β- لاکتاماز که پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها را غیرفعال می‌کنند؛ کلرامفنیکل استیل‌ترانسفراز که کلرامفنیکل را غیرفعال می‌کند؛ و فسفوترانسفرازها که آمینوگلیکوزیدهایی نظیر نئومایسین و جنتامایسین را تغییر می‌دهند.

1. House-keeping

ارتباط بالینی ۲-۸

پاتوژن باکتریایی معده: Helicobacter pylori

Helicobacter pylori (*H. pylori*) یک باکتری گرم منفی است که در معده و دوازدهه بیش از ۵۰٪ جمعیت انسانی جهان ایجاد عفونت می‌کند. شکل مارپیچی این ارگانیسم سبب تسریع در حرکت آن در موکوس پوشاننده مخاط معده می‌شود. با وجود این که اکثر افراد مبتلا علامتی را نشان نمی‌دهند، مشخص شده است که *H.pylori* علت بسیاری از موارد اولسرهای پپتیک (ضایعاتی در پوشش معده و دوازدهه)، التهاب معده، التهاب دوازدهه و سرطان‌های معده می‌باشد. این باکتری با تولید مقادیر زیادی آنزیم اوره‌آز می‌تواند در محیط شدیداً اسیدی معده زنده بماند؛ اوره‌آز اوره را به دی‌اکسید کربن و آمونیاک تجزیه می‌کند که سبب خنثی‌سازی اسید معده می‌شود. pH اسیدی بیان اوره‌آز و یک پروتئین کانالی دریچه‌دار - پروتونی اوره در *H.pylori* را در هر دو سطح رونویسی و پایداری mRNA، افزایش می‌دهد. درمان *H.pylori* معمولاً با استفاده از حداقل سه آنتی‌بیوتیک انجام می‌شود، ولی برخی ایزوله‌های *H.pylori* یافت شده‌اند که مقاومت به آنتی‌بیوتیک را نشان می‌دهند. دو پزشک استرالیایی، به‌نام‌های رابین وارن[1] و باری مارشال[2]، جایزه نوبل ۲۰۰۵ را در پزشکی به‌دلیل کار بر روی H.pylori دریافت کردند.

1. Robin Warren 2. Barry Marshall

RNA (tRNA، rRNA و mRNA) است. در اوکاریوت‌ها سه RNA پلیمراز متفاوت مورد استفاده قرار می‌گیرند (ص ۲۶۱). RNA پلیمراز I ژن‌های rRNA، RNA پلیمراز II ژن‌های کدکننده‌ای که رونوشت‌های آنها به مولکول‌های mRNA تبدیل می‌شوند، و RNA پلیمراز III ژن‌های مربوط به مولکول‌های tRNA و اکثر مولکول‌های کوچک دیگر RNA را رونویسی می‌کنند. با وجود اینکه برخی اصول فعال‌سازی و کنترل ژن اوکاریوتی برای هر سه نوع RNA پلیمراز کاربرد دارد، در این قسمت بر روی رونویسی توسط RNA پلیمراز II متمرکز می‌شویم. RNA پلیمراز II شامل حداقل ۱۰ زیرواحد مختلف، با اندازه ۱۰ تا ۲۲۰ kDa، است. برخی از این زیرواحدها همچنین قسمتی از کمپلکس‌های RNA پلیمراز I و III هستند و بقیه مختص RNA پلیمراز II می‌باشند. برحسب گونه، بزرگ‌ترین زیرواحد RNA پلیمراز II در دومن انتهای کربوکسیل[1] خود تا ۵۲ موتیف اسیدی تکراری PTSPSYS دارد. یک خصوصیت متمایزکننده این دومن این است که ریشه‌های ترئونین (T)، سرین (S) و تیروزین (Y) می‌توانند فسفریله شوند.

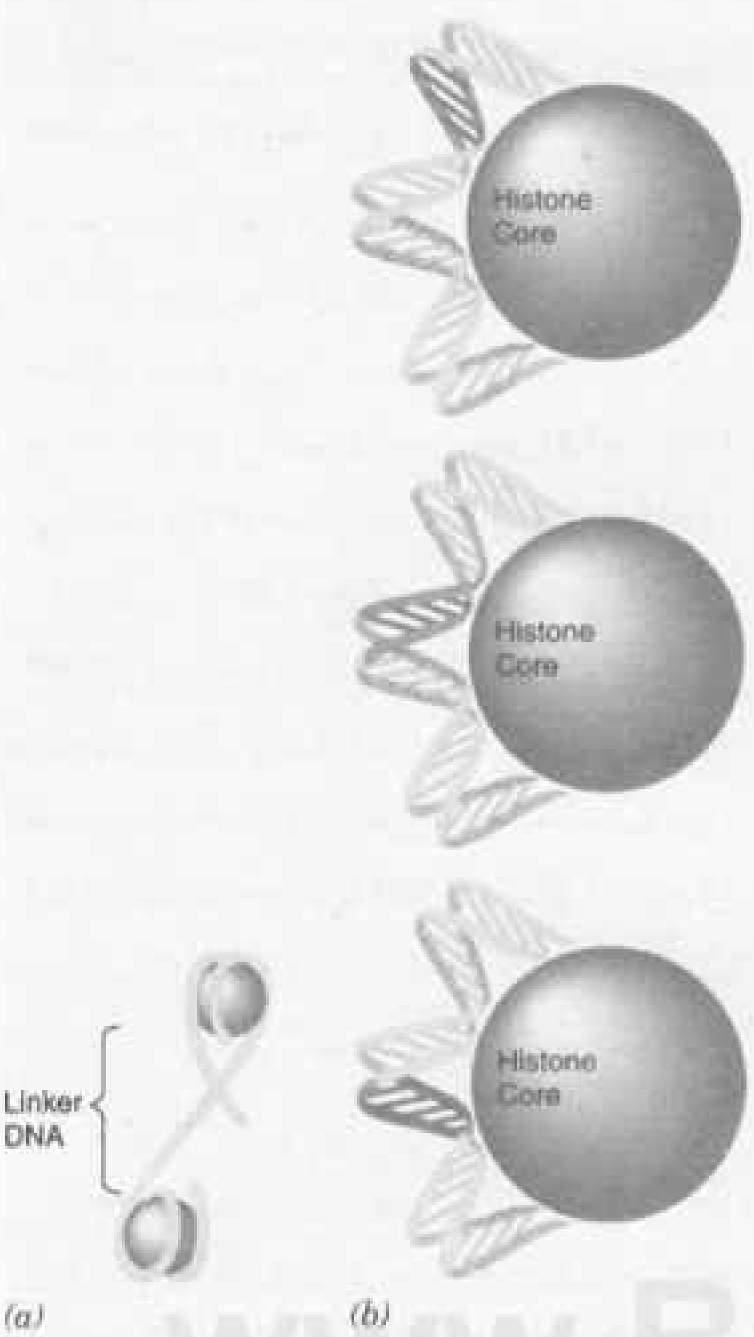
برای شناخت بهتر تنظیم رونویسی در اوکاریوت‌ها، یادآوری سازماندهی DNA به **کروماتین** و نقش تغییر DNA، به‌خصوص **متیلاسیون** سیتوزین، بر روی فعال‌سازی ژن مفید می‌باشد. به‌علاوه، خواهیم دید که RNA پلیمراز II به‌چه شکلی در موقعیت مناسبی در پروموتر یک ژن قرار می‌گیرد تا آن ژن را با تولید یک کمپلکس قبل شروع رونویسی کند که مستلزم همایش **فاکتورهای رونویسی عمومی** (TFs)[2] با RNA پلیمراز II است. سپس خواهیم دید که‌چطور فعالیت یک ژن اختصاصی با استفاده از فزاینده‌ها، **فاکتور جایگاه‌های اتصالی فاکتور رونویسی و جایگاه‌های همایش RNA پلیمراز**، تنظیم می‌گردد. بالاخره، فعال‌سازی رونویسی توسط فاکتورهای رونویسی اختصاصی، برخی خصوصیات عمومی آنها و نحوه تنظیم آنها مورد بحث قرار خواهند گرفت.

DNA اوکاریوتی به هیستون‌ها اتصال می‌یابند تا تولید کروماتین کنند

قطعاتی از DNA اوکاریوتی در اطراف اکتامری از پروتئین‌های هیستونی پیچیده می‌شود که حاوی دو مولکول از هر کدام هیستون‌های H2A، H2B، H3 و H4 در جهت تولید **نوکلئوزوم‌ها** می‌باشد (ص ۷۶). هیستون‌ها به‌واسطه تعاملات الکتروستاتیک به DNA می‌پیوندند. هیستون‌ها تعداد زیادی ریشه لیزین با بار مثبت دارند که با اسکلت فسفودی‌استری حاوی بار منفی DNA تعامل می‌کنند. در اکثر سلول‌ها، بعد از آن که همبستگی اکتامر-DNA صورت گرفت، هیستون H1 یا H5 اتصال می‌یابد. حدود ۲۰۰ bp از DNA یک واحد نوکلئوزومی را ایجاد می‌کند که ۱۶۰-۱۳۰ bp آن در تماس مستقیم با هسته اکتامری است. مقداری از DNA باقیمانده به H1 و H5 اتصال می‌یابد و بقیه DNA رابط بین نوکلئوزوم‌ها می‌باشد. با وجود این که تعامل DNA-اکتامر هیستونی فاقد ویژگی

1. C- Terminal domain 2. General transcription factors

برای توالی است، مقداری الگوی همبستگی وابسته به توالی گزارش شده است. برای مثال، وقتی مارپیچ DNA دو-رشته به دلیل وجود یک ناحیه غنی از AT تا می‌شود، شیار کوچک عموماً به سمت هسته نوکلئوزومی می‌باشد. در نواحی غنی از GC، شیار کوچک به دور از هسته اکتامری هیستونی است. برخلاف این تمایلات، راه مشخصی برای پیش‌بینی توالی‌ها در داخل یک دورشته DNA وجود ندارد که براساس آن بتوان ترکیب شیارهای بزرگ و کوچک موجود در خارج کمپلکس نوکلئوزومی را تعیین نمود. این نوع قرارگیری مهم است، زیرا همایش کمپلکس شروع رونویسی و اتصال سایر پروتئین‌هایی که بر روی بیان ژن تأثیر می‌گذارند، نیاز به دسترسی به شیارهای موجود در دورشته DNA دارد. تعاملات توالی- اختصاصی‌تر از طریق پیوندهای هیدروژنی رخ می‌دهد که با لبه‌های مربوط به جفت‌بازها در شیار بزرگ یا کوچک تشکیل می‌شوند. وقتی DNA به دور یک اکتامر هیستونی پیچیده می‌شود، توالی‌های اختصاصی DNA که فاکتورهای رونویسی به آنها اتصال می‌یابند، ممکن است پنهان شوند. برای دسترسی به توالی‌های اختصاصی، برداشت کامل DNA از نوکلئوزوم لازم نیست. با چرخاندن مارپیچ DNA نسبت به اکتامر هیستونی، امکان برقراری تماس‌های مختلف شیار بزرگ و کوچک در سطح خارجی نوکلئوزوم فراهم می‌گردد (شکل ۱۷-۸).



شکل ۱۷-۸ دسترسی به توالی‌های اختصاصی موجود در شیارهای بزرگ و کوچک DNA بستگی به وضعیت نوکلئوزوم دارد. (a) DNAای که در اطراف هسته اکتامر هیستونی (دو ملکول از هرکدام از هیستون‌های H2A، H2B، H3 و H4) تابیده شده است را ذره نوکلئوزومی گویند. در بیشتر مواقع H1 یا H5 (نشان داده نشده است) به محلی در DNA می‌پیوند که از آنجا تابیدن در اطراف اکتامر هیستونی آغاز می‌شود. DNA بین ذرات هسته نوکلئوزومی را DNA رابط گویند. وقتی DNA در معرض عواملی نظیر نوکلئاز میکروکوکی قرار می‌گیرد، نواحی رابط نسبت به DNAای که در اطراف ذره هسته هیستونی تابیده شده است، بیشتر در دسترس قرار دارد. (b) در داخل نوکلئوزوم، سمتی از مارپیچ که به دور از هسته هیستونی است، قابل‌دسترسی می‌باشد، ولی سمتی که به‌طرف آن است، این‌طور نیست. در صورتی‌که مارپیچ را نسبت به هسته هیستونی یک نوکلئوزوم بچرخانیم و موقعیت پنج جفت باز را دنبال کنیم، دسترسی به شیار بزرگ و کوچک به سایر تعاملات برحسب اینکه جفت باز در داخل یا خارج ذره هسته نوکلئوزومی قرار دارد، تغییر می‌کند.

ژن‌هایی که در داخل یک سلول خاص رونویسی نمی‌شوند، هتروکروماتین شدیداً متراکمی را به‌وجود می‌آورند. برعکس، نواحی دارای فعالیت رونویسی DNA تراکم کمتری داشته و ساختمان بازتری دارند. قسمتی از این تفاوت ناشی از تغییر بعد از ترجمه هیستون‌ها است. استیلاسیون گروه ε-آمینوی ریشه‌های لیزین در نزدیکی انتهای آمینوی هیستون‌ها سبب کاهش بار مثبت و بنابراین تضعیف تعامل الکترواستاتیک بین هیستون‌ها و DNA می‌گردد. در مجموع، استیلاسیون هیستون‌ها منجر به فعال‌سازی ژن می‌شود، در حالی‌که داستیلاسیون این اثر را معکوس می‌کند. استیلاسیون هیستون‌ها و تغییر بعدی در موقعیت نوکلئوزوم به‌واسطه تضعیف تعاملات هیستون-DNA، در فراهم‌سازی امکان دسترسی به توالی‌های اختصاصی DNA مهم است (شکل ۱۸-۸). همان‌طور که در ادامه این فصل خواهیم دید، معتقدند تغییر هیستون‌ها اهمیت فوق‌العاده‌ای در کنترل اپی‌ژنتیکی بیان ژن دارد.

موقعیت نسبی یک نوکلئوزوم همچنین می‌تواند تحت تأثیر کمپلکس SWI-SNF قرار گیرد که برای اولین و به بهترین شکل در مخمر *S.cerevisiae* شناسایی شد و براساس سوییچ نوع جفت‌گیری[1] و سوش‌های غیرتخمیرکننده سوکروز نامگذاری شد. این کمپلکس حاوی حدود ۱۰ پروتئین بوده و با دومن انتهای کربوکسیل زیرواحد بزرگ RNA پلیمراز II تعامل نموده و سبب تخریب دستجات نوکلئوزومی به‌طریق وابسته به ATP می‌شود. نتیجه باز نمودن نواحی از DNA برای تعامل با فاکتورهای رونویسی و بنابراین تسهیل فعال‌سازی ژن می‌باشد. در مقایسه با ژن‌هایی که رونویسی می‌شوند، تعداد کمتری کمپلکس SWI/SNF

1. Mating type switching

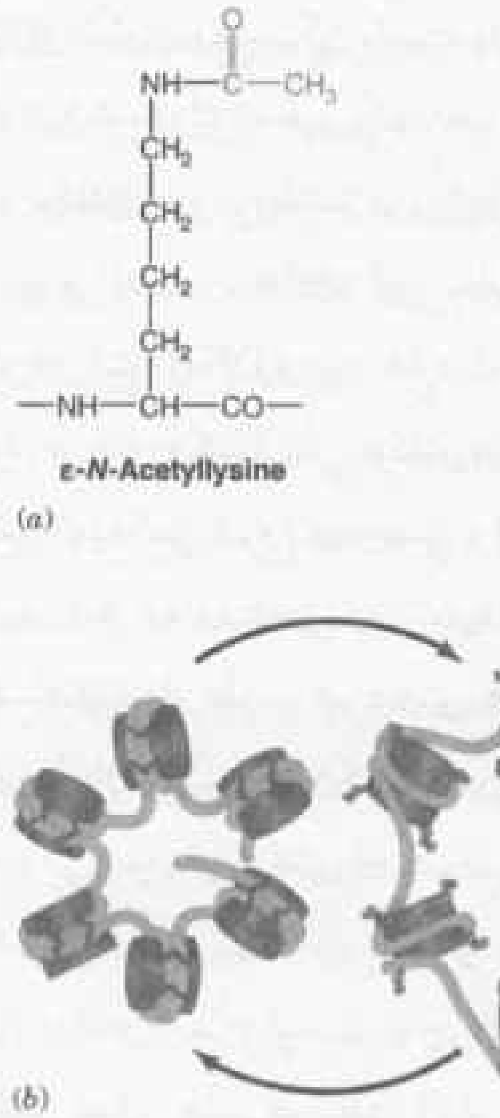
ارتباط بالینی ۳-۸

سندروم روبینشتن- تای‌بی

تنظیم استیلاسیون هیستون بر روی فعال‌سازی و غیرفعال‌سازی بیان ژن تأثیر دارد. دو آنزیم اصلی مسئول استیلاسیون هیستون‌ها در سلول‌های پستانداران شامل استیل‌ترانسفرازهای p300 و CBP می‌باشند. p300 براساس جرم ملکولی خود نامگذاری شده است و CBP مخففی برای پروتئین اتصالی CREB[1] می‌باشد که خود CREB (پروتئین اتصالی به عنصر تنظیمی cAMP[2]) یک فاکتور رونویسی است. این استیل‌ترانسفرازها اجازه فعال‌سازی ژن‌های مناسب مرتبط با CREB و سایر فاکتورهای رونویسی را داده و منجر به بازشدن ساختمان کروماتین از طریق تضعیف تعاملات هیستون-DNA می‌شوند.

سندروم روبینشتن-تای‌بی[3] (OMIM۱۸۰۸۴۹) که با عقب‌ماندگی ذهنی و سایر ناهنجاری‌های نموی مشخص می‌گردد، ناشی از جهش‌های نقطه‌ای، حذف‌های کوچک و نوآرایی‌هایی در ژن CBP می‌باشد. نقص‌های نموی شدیدتر با جهش‌های بیشتری ارتباط دارند. از دست رفت کامل محصول ژن CBP احتمالاً کشنده است.

1. CREB binding protein
2. cAMP regulatory-element binding protein
3. Rubinstein-Taybi

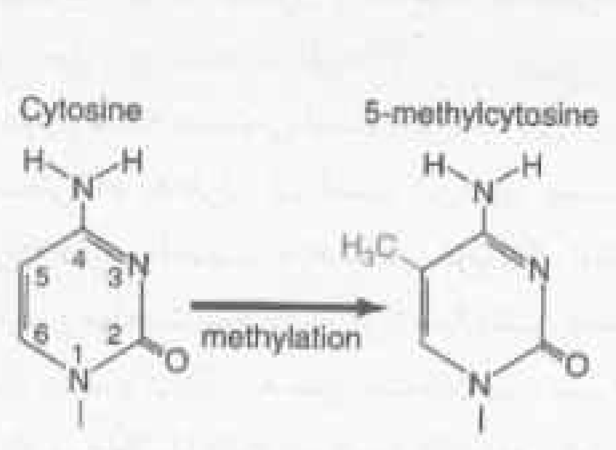


شکل ۱۸-۸ قدرت همبستگی هیستون و DNA از طریق استیلاسیون ریشه‌های لیزین موجود در انتهای آمینوی پروتئین‌های هیستونی تغییر داده می‌شود. هیستون‌هایی که هسته اکتامری را می‌سازند، حاوی ریشه‌های لیزینی هستند که گروه‌های با بار مثبت جانبی آنها تعامل با اتصالات فسفودی‌استری با بار منفی DNA را تسریع می‌کنند. تغییر این لیزین‌ها از طریق استیلاسیون سبب جایگزینی این بارهای مثبت با یک گروه استیل خنثی و تضعیف تعامل الکترواستاتیک بین هسته اکتامری و DNA می‌شود. این فرایند قابل برگشت است و استیلاسیون و داستیلاسیون هیستون‌ها راهی برای شُل و سفت کردن ساختمان کروماتین است.

در سلول وجود دارد که مطرح‌کننده عمل کمپلکس SWI/SNF به شکل کاتالیتیکی می‌باشد (ارتباط بالینی ۳-۸).

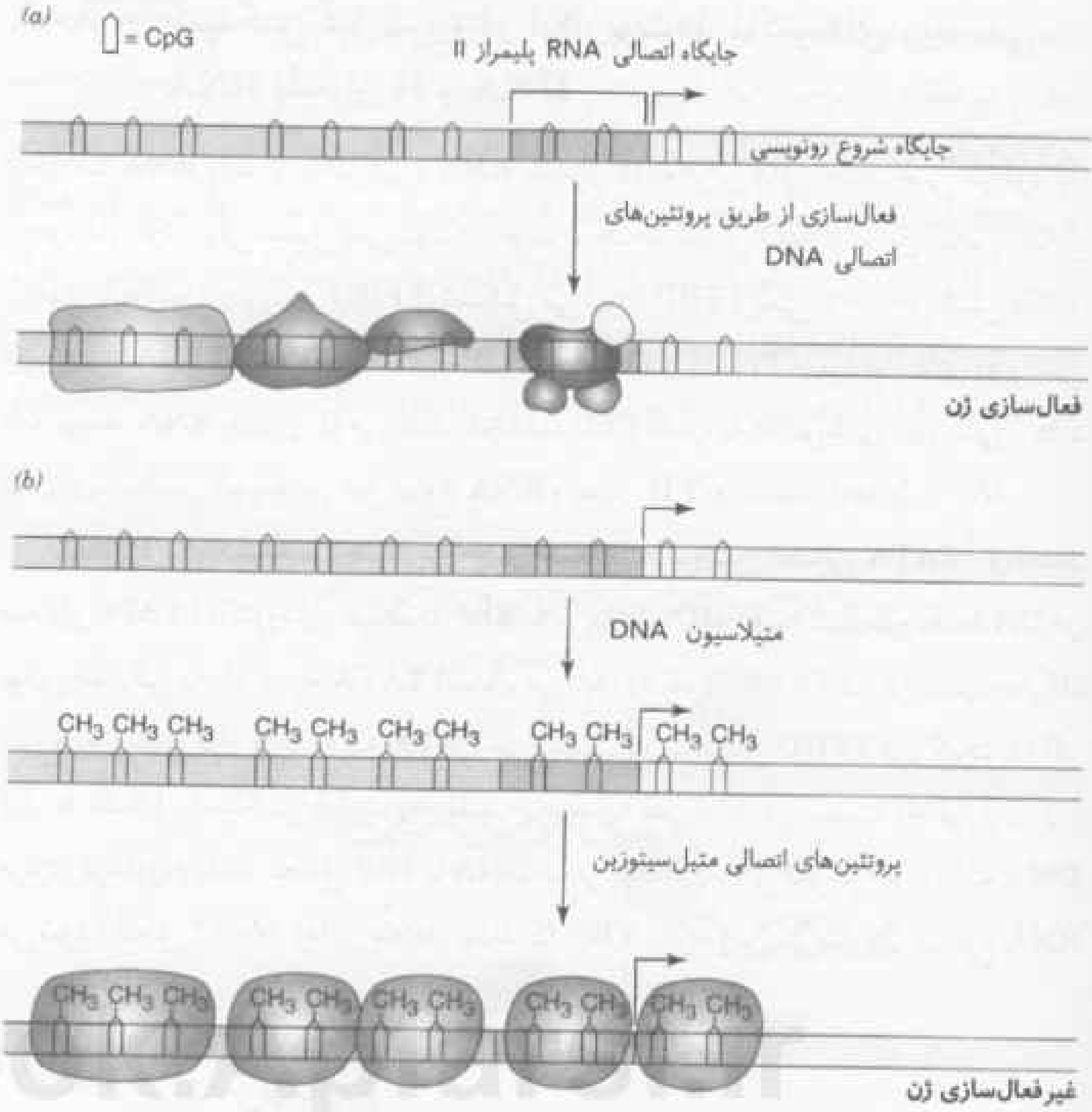
متیلاسیون DNA با غیرفعال‌سازی ژن در ارتباط است

متیلاسیون DNA انسانی همراه با تولید ۵-متیل سیتوزین می‌باشد (شکل ۱۹-۸). این واکنش ویژگی توالی دارد و ′5′CpG3 سوبسترای آن است. نتیجه این است که هر دو رشته متیله می‌شوند. حدود ۷۰٪ توالی‌های CpG در DNA انسانی متیله می‌باشد. متیلاسیون در اثرگذاری[1] DNA ژنومی نقش دارد. در اثرگذاری، الگوهای متیلاسیون DNA که از اسپرم و تخمک انتخاب شده است، با انتخاب بیان آللی در ارتباط است. الگوهای متیلاسیون بعد از همانندسازی توسط یک همی‌متیلاز حفظ می‌شوند (که متیلاسیون را در رشته مادری شناسایی کرده و رشته تازه سنتز را متیله می‌کند). اخیراً مطرح شده است که متیلاسیونی که منجر به خاموش‌سازی ژن می‌شود، می‌تواند با فعالیت siRNAهای (RNA مداخله‌گر کوتاه[2]) القاء گردد که مکمل توالی است که متیله می‌شود.



شکل ۱۹-۸ ۵-متیل‌سیتوزین معمول‌ترین باز متیله در انسان است.

1. Imprinting 2. Short interfering RNA



شکل ۲۰-۸ متیلاسیون DNA منجر به تغییر فعالیت ژن می‌شود. برای حداکثر رونویسی اکثر ژن‌ها لازم است فاکتورهای رونویسی توالی‌های DNA موجود در ناحیه پروموتری را شناسایی نموده و به آنها اتصال یابند. تعامل این فاکتورها با DNA و فاکتورهای رونویسی عمومی موجود در کمپلکس شروع RNA پلیمراز II منجر به بیان یک ژن می‌شود. متیلاسیون DNA، به‌خصوص تولید ۵-متیل سیتوزین، هدف جدیدی را برای تعامل پروتئین با DNA فراهم می‌سازد. پیوستن پروتئین‌های اتصالی 5-me C DNA به DNA متیله ممکن است مانع از اتصال فاکتورهای رونویسی به DNA شود. این اثر مهاری معمولاً از طریق رقابت اختصاصی توالی برای اتصال به DNA نیست، بلکه به دلیل ممانعت فضایی می‌باشد.

در ارتباط متیلاسیون DNA اغلب با واژه جزایر *CpG*[1] یا نواحی غنی از *CpG*[2] مواجه می‌شویم. توالی CpG در ژنوم کمتر مشاهده می‌گردد. این موضوع احتمالاً به دلیل تجمع ترانزیشن C به T حاصل از دآمیناسیون ۵-متل سیتوزین، طی نسل‌های متمادی می‌باشد. حفظ CpGها احتمالاً به‌واسطه فشار انتخابی برای حفظ یک ناحیه تنظیمی است. در حقیقت، جزایر CpG بیشتر در نواحی پروموتری دیده می‌شوند. متیلاسیون DNA اغلب با کمبود فعالیت رونویسی همراه است. معتقدند این موضوع به‌واسطه پروتئین‌هایی می‌باشد که DNA متیله را شناسایی کرده و به آن اتصال می‌یابند، که مانع اتصال فاکتورهای رونویسی می‌شود. متیلاسیون DNA با داستیلاسیون هیستون‌ها ارتباط دارد که دو وسیله متفاوت را برای سرکوب رونویسی در موقعیت اختصاصی فراهم می‌کند (شکل ۲۰-۸).

هیپرمتیلاسیون DNA یکی از خصوصیات معمول سلول‌های موجود در بافت سرطانی است. شواهد رو به افزایشی وجود دارند که نشان می‌دهند متیلاسیون در ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی رخ می‌دهد که سلول‌های با تقسیم غیرطبیعی را به مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) هدایت می‌کنند. برعکس، در سلول‌های توتی پوتنت[3] و پلوری پوتنت[4]، نظیر تخم باورشده و سلول‌های بسیار ابتدایی رویانی، DNA متحمل دمتیلاسیون نسبتاً کلی می‌شود.

1. CpG islands 2. CpG-rich regions 3. Totipotent 4. Pluripotent

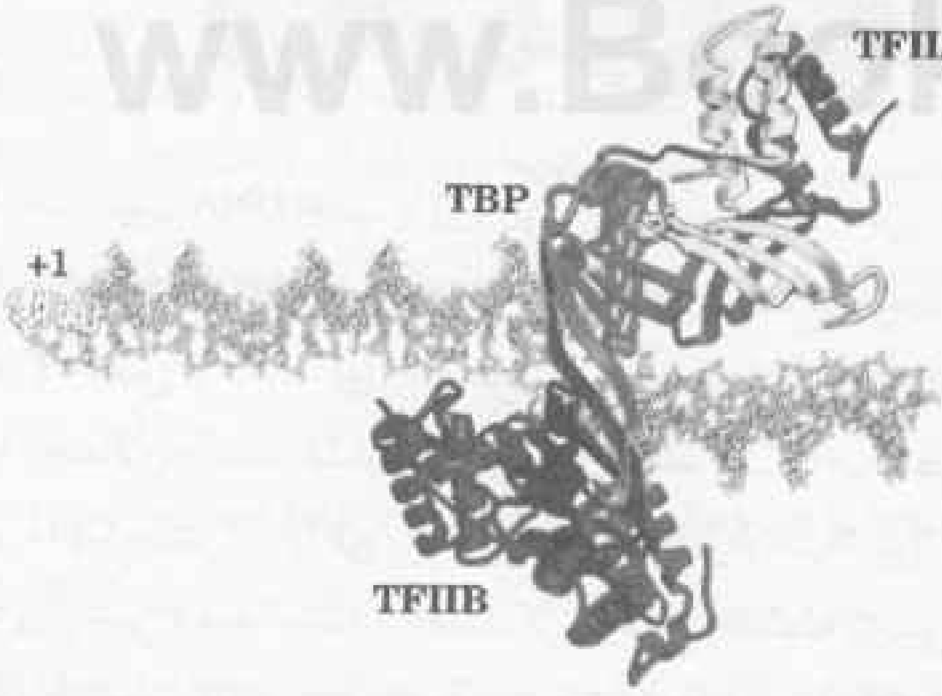
جدول ۱-۸ • فاکتورهای رونویسی عمومی موجود در اوکاریوت‌ها

فاکتور	تعداد زیر واحد	جرم (kDa)
TFIID		
TBP	۱	۳۸
TAFs	۱۲	۱۵-۲۵۰
TFIIA	۳	۱۲ ،۱۹ ،۳۵
TFIIB	۱	۱۵
TFIIE	۲	۳۴ ،۵۷
TFIIF	۲	۳۰ ،۷۴
TFIIH	۹	۳۵-۸۹

۸-۸ • کمپلکس قبل‌شروع در اوکاریوت‌ها: فاکتورهای رونویسی، RNA پلیمراز II و DNA

برخلاف RNA پلیمراز باکتریایی، RNA پلیمراز II به توالی‌های اختصاصی موجود در پروموترهای اوکاریوتی متصل نمی‌شود. در عوض، یک کمپلکس شروع از طریق تماس ابتدایی پروموتر با فاکتور رونویسی TFIID، تشکیل می‌شود. TFIID یکی از حداقل شش فاکتور رونویسی (TFIIA، TFIIB، TFIID، TFIIE، TFIIF و TFIIH) مورد نیاز برای رونویسی پایه توسط RNA پلیمراز II می‌باشد. مخفف TFII اشاره به فاکتورهای رونویسی[1] دارد که برای همایش کمپلکس قبل‌شروع RNA پلیمراز II لازم هستند (جدول ۱-۸).

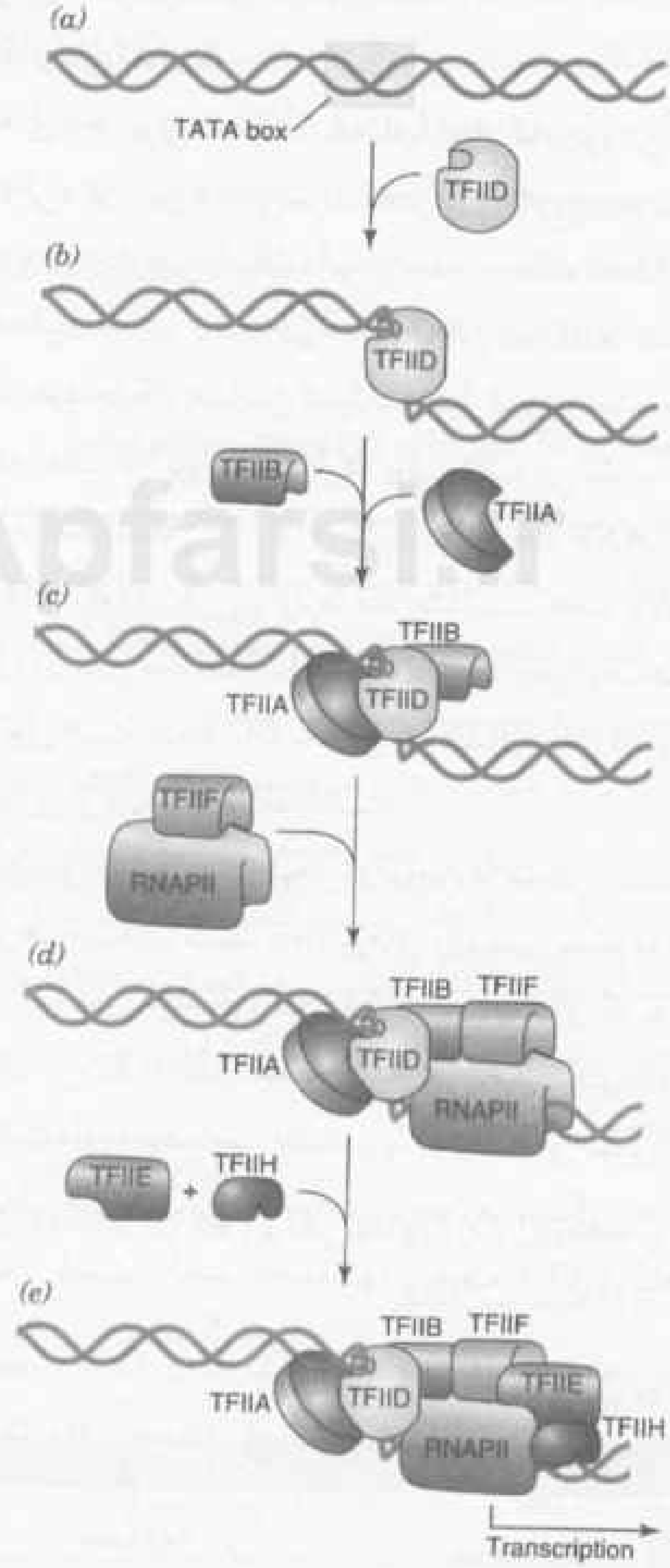
TFIID یک کمپلکس چند زیرواحدی متشکل از پروتئین اتصالی TATA[2] و تعداد متفاوتی TAFs (فاکتورهای مرتبط با TBP[3]) می‌باشد. TFIID به شیار کوچک DNA در توالی مشترکی به‌نام جعبه TATA اتصال می‌یابد که تقریباً ۲۷ bp در فرادست جایگاه شروع رونویسی قرار دارد. جعبه TATA می‌بایست در دسترس TFIID قرار گیرد، لذا اگر قرار به تشکیل کمپلکس قبل‌شروع باشد، این جعبه نمی‌تواند در سمت داخلی یک ذره مرکزی نوکلئوزوم باشد. تعامل TBP با DNA منجر به تغییر شکل قابل‌توجه دورشته DNA می‌شود (شکل ۲۱-۸). زمانی معتقد بودند که TBP برای رونویسی توسط هر نوع RNA



شکل ۲۱-۸ **پروتئین اتصالی TATA (TBP) همراه با DNA کریستالیزه شده است.** اولین مرحله در تولید کمپلکس رونویسی که امکان رونویسی ژن به‌واسطه RNA پلیمراز II را فراهم می‌سازد، اتصال فاکتور رونویسی عمومی TFIID به DNA می‌باشد. در بیشتر موارد این عمل از طریق یکی از پروتئین‌های کمپلکس پروتئینی TFIID، TBP، انجام می‌شود که از طریق تعامل با توالی TATAA وساطت می‌گردد. کریستالیزاسیون TBP با DNA امکان بررسی دقیق‌تر این تعامل را فراهم می‌سازد و نشان می‌دهد که اتصال TBP سبب ایجاد یک خمیدگی قابل‌توجه در DNA می‌شود. در این شکل دو فاکتور رونویسی عمومی دیگر، شامل TFIIA و TFIIB، نیز وجود دارند که هیچکدام از آنها در تماس اولیه با DNA نقشی ندارند. TFIIA به TBP اتصال یافته و تعامل TBP-DNA را تثبیت می‌کند. اتصال TFIIB به TBP منجر به فراخوانی RNA پلیمراز II به کمپلکس شروع می‌شود و در شناسایی جایگاه شروع رونویسی نقش دارد.

1. Ranscription factors 2. TATA binding protein 3. TBP-associated factors

پلیمرازی مورد نیاز است، ولی شناسایی اخیر فاکتورهای TBP- مانند[1] (TLFs) دیگر مطرح می‌نماید که برخی ژن‌ها از پروتئین دیگری استفاده می‌کنند. بعد از اتصال به جعبه TATA، TBP همایش کمپلکس قبل‌شروع را با افزودن منظم چند فاکتور رونویسی عمومی و RNA پلیمراز II هدایت می‌کند (شکل ۲۲-۸). بیاد دارید که زیرواحد بزرگ RNA پلیمراز II یک دومن انتهای کربوکسیل[2] (CTD) دارد که در آن تکرارهای متعددی از توالی اسید آمینه‌ای PTSPSYS یافت می‌شود. RNA پلیمراز II زمانی وارد کمپلکس قبل‌شروع می‌شود که CTD آن فسفریله نباشد. هر چند، دورشدن RNA پلیمراز II از جایگاه همایش



شکل ۲۲-۸ تولید کمپلکس شروع برای ژن‌هایی که توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شوند، منظم است. مدل‌های رایج همایش کمپلکس شروع شامل مراحل زیر است: (a) ناحیه پروموتری یک ژن با یک جعبه TATA قبل از اتصال TFIID. (b) TFIID که شامل TBP است، به جعبه TATA اتصال یافته و DNA را تا می‌کند. (c) کمپلکس DNA-TFIID به عنوان یک جایگاه هماهنگ برای اتصال سایر فاکتورهای رونویسی عمل می‌کند. کمپلکس TFIID به TFIIA و TFIIB اتصال می‌یابد. TFIIA سبب تثبیت تعامل TFIID با DNA می‌شود و TFIIB یک جایگاه تعامل مناسب برای اتصال RNA پلیمراز II فراهم می‌کند. (d) TFIIF و RNA پلیمراز II به کمپلکس می‌پیوندند. در این مرحله دومن انتهای کربوکسیل (CTD) در RNA پلیمراز II غیرفسفریله است. معتقدند TFIIF سبب ناپایداری تعاملات غیراختصاصی RNA پلیمراز II با DNA می‌شود و بنابراین RNA پلیمراز II را به کمپلکس شروع در حال رشد هدایت می‌کند. (e) دو فاکتور رونویسی عمومی دیگر به کمپلکس می‌پیوندند. TFIIE فاکتور TFIIH را به کمپلکس فرا می‌خواند. TFIIH فعالیت‌های هلیکازی، ATPase و کینازی دارد. معتقدند TFIIH بازشدن موقتی دورشته DNA و همچنین فسفریلاسیون CTD در RNA پلیمراز II را وساطت می‌کند که کمپلکس شروع را ترک کرده و شروع رونویسی را آغاز می‌کند.

1. TBP-like factors 2. C-terminal domain

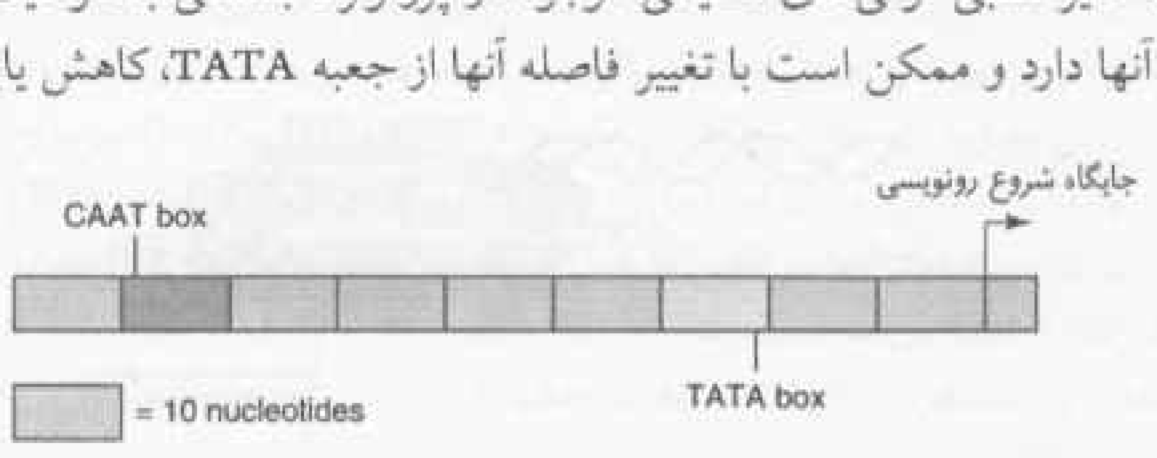
با فسفریلاسیون CTD همراه است. لذا همایش کمپلکس قبل‌شروع تضمینی برای رونویسی نیست؛ برای شروع رونویسی نیاز به پیام دیگری نظیر فسفریلاسیون می‌باشد.

تولید کمپلکس قبل‌شروع به فعالیت هلیکازی وابسته به ATP مرتبط با TFIIH اجازه بازنمودن دو رشته DNA و فراهم‌سازی یک الگو برای فاز طویل‌سازی بعدی سنتز RNA را می‌دهد. TFIID همچنان متصل به جعبه TATA باقی می‌ماند تا همایش کمپلکس‌های قبل‌شروع دیگر را تسریع کند. طی فاز طویل‌سازی، TFIID همراه با RNA پلیمراز II حرکت می‌کند، ولی فاکتورهای رونویسی دیگر از کمپلکس طویل‌سازی جدا می‌شوند.

پروموترهای اوکاریوتی و توالی‌های دیگری که بر روی رونویسی تأثیر می‌گذارند

پروموترهای مربوط به ژن‌های اوکاریوتی که توسط RNA پلیمراز II رونویسی می‌شوند، از نظر عملکرد به‌صورت توالی‌هایی تعریف می‌شوند که بر روی شروع رونویسی ژن تأثیر می‌گذارند. مشخصه پروموترهای اوکاریوتی، استفاده آنها از چندین جایگاه اتصال به فاکتورهای رونویسی جهت تنظیم فعالیت ژن می‌باشد. در مجموع، این جایگاه‌ها نسبتاً به جعبه TATA نزدیک هستند که خود جایگاه همایش کمپلکس قبل‌شروع را مشخص می‌کند. سایر توالی‌های مشترک که اغلب در پروموترهای اوکاریوتی یافت می‌شوند، شامل جعبه CAAT و جعبه‌های GC هستند (شکل ۲۳-۸). موقعیت دقیق جعبه CAAT و موقعیت، جهت‌گیری و تعداد جعبه‌های GC در بین پروموترها متفاوت است. جعبه CAAT جایگاه اتصالی برای چندین فاکتور رونویسی مختلف، شامل NF1، است. وجود یک جعبه CAAT معمولاً نشانه یک پروموتر قوی است. جعبه GC یک جایگاه اتصالی برای فاکتور رونویسی Sp1 دارد و مشخصه بسیاری از ژن‌های خانه‌دار است.

اتصال فاکتورهای رونویسی به توالی‌های دیگر در پروموترها ممکن است تحت تأثیر یک ملکول پیام رسان، نظیر هورمون‌های مرتبط با فاکتورهای رونویسی پاسخ به استروئید، یا تغییری نظیر فسفریلاسیون اسیدهای آمینه، قرار گیرد. توالی‌های DNAای که به فاکتورهای رونویسی تنظیم‌شونده اتصال می‌یابند را اغلب **عناصر پاسخ**[1] می‌نامند. فاکتورهای رونویسی ممکن است منحصر به بافت‌های اختصاصی باشند و یا در زمان‌های نموی اختصاصی ظاهر شوند. تأثیر نسبی توالی‌های تنظیمی موجود در پروموترها بستگی به موقعیت یا جهت‌گیری آنها دارد و ممکن است با تغییر فاصله آنها از جعبه TATA، کاهش یابد.



شکل ۲۳-۸ توالی‌های DNA در ژن‌هایی که در اوکاریوت‌ها رونویسی می‌شوند، معمولاً حاوی یک کادر TATA است و ممکن است یک جعبه CAAT، نواحی غنی از GC (جعبه‌های GC) و چندین جایگاه اتصال فاکتور رونویسی نیز داشته باشند.

1. Response elements

بسیاری از ژنوم‌های سلولی و ویروسی حاوی **عناصر فزاینده**[1] هستند که به پروتئین‌هایی اتصال می‌یابند که رونویسی را فعال می‌کنند. فزاینده‌ها از نظر دو خصوصیت مهم متفاوت از توالی‌های پروموتری هستند. اول، فزاینده‌ها می‌توانند هزاران جفت باز به دور از جایگاه همایش کمپلکس قبل‌شروع و همچنین در فرادست یا فرودست جایگاه شروع رونویسی قرار داشته باشند. دوم، عنصر فزاینده می‌تواند در هر دو جهت عمل کند. فاکتورهای رونویسی که به عناصر پاسخ موجود در نزدیکی جایگاه شروع اتصال می‌یابند، ممکن است مستقیماً همراه با کمپلکس شروع و یا از طریق به‌کارگیری پروتئین‌هایی که پلی به کمپلکس شروع-کننده برقرار می‌کنند، عمل نمایند (شکل ۳۰-۸ را ببینید). این عملکرد پلی برای پروتئین‌هایی که بر روی رونویسی تأثیر می‌گذارند، کاملاً معمول است. هرچند، فاصله خطی بین یک فزاینده و یک کمپلکس قبل‌شروع ممکن است بسیار بزرگ باشد. فاکتورهای رونویسی که به فزاینده‌ها اتصال می‌یابند، با ایجاد قوس در DNA، در کمپلکس قبل شروع در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. این موضوع به توجیه اینکه چرا فزاینده می‌تواند با فاصله عمل کند و یا چرا جهت‌گیری فزاینده مهم نیست، کمک می‌کند. وقتی پروتئین به فزاینده اتصال یافت، صف‌بندی مناسب پروتئین با کمپلکس قبل‌شروع، با برگشت به عقب DNA تنظیم می‌گردد.

طراحی قطعه‌ای فاکتورهای رونویسی اوکاریوتی

فاکتورهای رونویسی اوکاریوتی دومن‌های متعددی برای انجام تعاملات اختصاصی دارند. دومن‌های شناسایی DNA در اتصال اختصاصی - جایگاه نقش دارند و دومن‌های فعال‌سازی در اتصال فاکتورهای رونویسی عمومی، RNA پلیمراز II یا سایر تنظیم‌کننده‌های رونویسی همکاری دارند. بسیاری از فاکتورهای رونویسی همچنین حاوی دومن‌های دیمریزاسیون که تولید هُمودیمرها یا هترودیمرها را می‌کنند، دومن‌های تعامل پروتئینی که امکان پیوستن به پروتئین‌هایی نظیر هیستون استیلاز را فراهم می‌سازند، یا دومن‌هایی برای اتصال به کمک فعالگرها می‌باشند. کمک فعالگرها شامل هورمون‌های استروئیدی و cAMP هستند که توانایی فاکتور رونویسی در اتصال به DNA یا عمل به‌عنوان یک فعالگر را تغییر می‌دهند. دومن‌هایی که در چنین فعالیت‌هایی نقش دارند را می‌توان به چند موتیف مشخص گروه‌بندی نمود.

موتیف‌های معمول در پروتئین‌هایی که به DNA اتصال می‌یابند و رونویسی را تنظیم می‌کنند

معمولاً چندین موتیف اسید آمینه‌ای در فاکتورهای رونویسی (تنظیم‌کننده‌های با فعالیت ترانس[2]) وجود دارند که شامل **مارپیچ-پیچ-مارپیچ**[3] **(HTH)**، **انگشت روی**[4]، **مارپیچ-قوس-مارپیچ**[5] **(HLH)** و پروتئین‌های زیپ لوسینی-ناحیه بازی[6] (bZIP) می‌باشند

1. Enhancer elements
2. Transacting regulators
3. Helix-turn-helix
4. Zinc finger
5. Helix-loop-helix
6. Basic region-leucine zipper

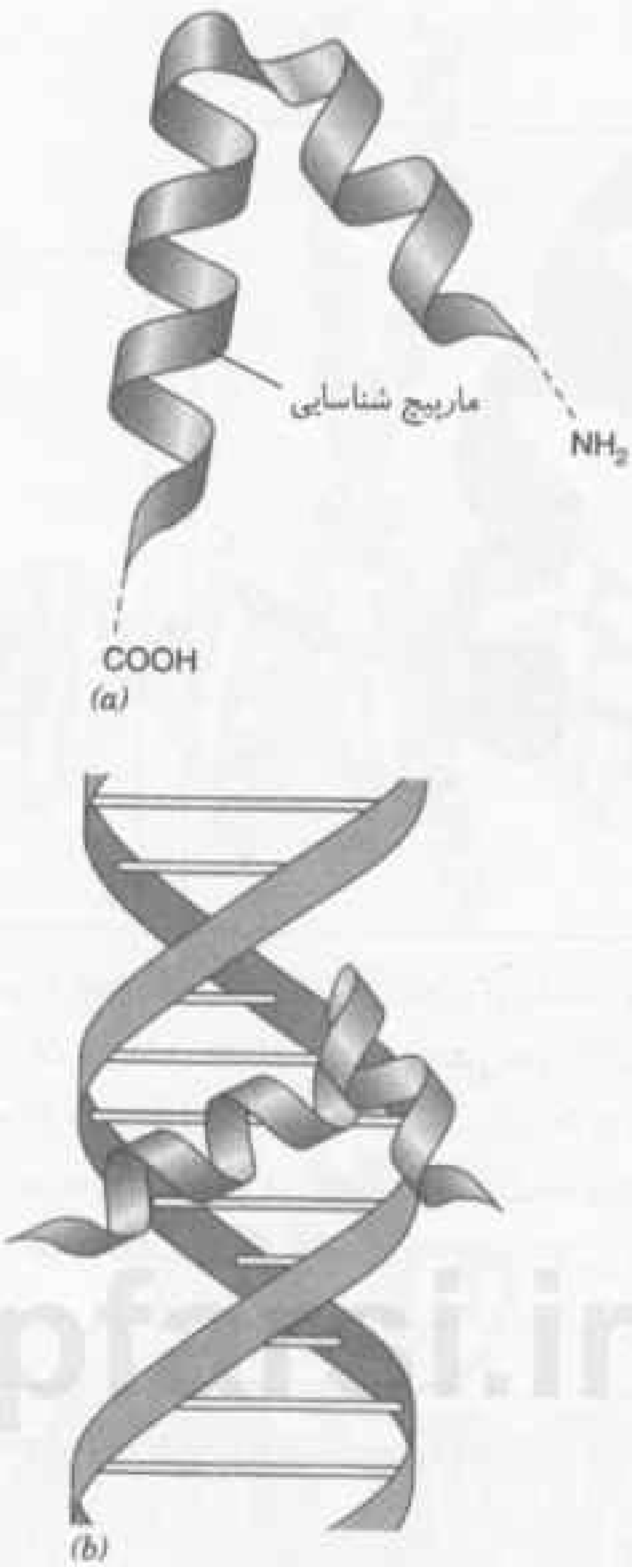
(ص ۴۴۴). ایـن موتیف‌ها در حدود ۸۰٪ پـروتئین‌های اتصالی توالی-اختـصاصی وجود دارند.

سرکوبگر لاکتوز در *E.coli* (قسمت ۳-۸ را ببینید) و گروهی از فاکتورهای رونویسی که در نمو مهم هستند و پروتئین‌های هُمودومن[1] نامیده می‌شوند، از میان پروتئین‌های دارای موتیف مارپیچ-پیچ-مارپیچ (HTH) هستند. هُمودومن قسمت شناسایی DNA این فاکتورهای رونویسی است. پروتئین‌های هُمودومن برای اولین بار در مگس میوه و در زمانی مورد شناسایی قرار گرفتند که مشاهده شد جهش در ژن‌های کدکننده آنها منجر به هُمئوز[2] یا قراگیری یک قسمت از بدن به‌جای دیگری، می‌شود. برای مثال، جهشی در یک پروتئین هُمودومن می‌تواند سبب شود تا پاها در محل شاخک‌ها تشکیل شوند. در پستانداران نیز پروتئین‌های هُمودومن تنظیم‌کننده‌های کلیدی نمو هستند. موتیف HTH حدود ۲۰ اسید آمینه دارد و بخش نسبتاً کوچکی از یک پروتئین بسیار بزرگتر را شامل می‌شود. در این موتیف، هفت اسید آمینه ابتدایی مارپیچی را به‌وجود می‌آورند که به‌دنبال آن یک پیچ چهار اسید آمینه‌ای و سپس یک مارپیچ نُه اسید آمینه‌ای وجود دارد. مارپیچ دوم مارپیچ شناسایی[3] است که به شکل اختصاصی-توالی به شیار بزرگ اتصال می‌یابد، در حالی‌که تعاملات آبگریز بین اولین و دومین مارپیچ این ساختمان را تثبیت می‌کند. بقیه پروتئین ممکن است جایگاه‌های آلوستریکی داشته باشد که به ملکول‌ها و توالی‌های تنظیمی اتصال می‌یابند که امکان تعاملات پروتئین-پروتئین دیگر را فراهم می‌سازد. (شکل ۲۴-۸).

TFIIIA که یک فاکتور رونویسی عمومی است و به پروموترهای رونویسی‌شونده توسط RNA پلیمراز III اتصال می‌یابد، SP1 که سبب تحریک ۱۰ تا ۲۰ برابر تمامی ژن‌های حاوی جعبه GC می‌شود، Gal4 در مخمر و فوق خانواده گیرنده هورمون استروئیدی، همگی مثال‌هایی از پروتئین‌های انگشت روی هستند. براساس اسیدهای آمینه اختصاصی که در متناسب‌سازی[4] اتصال Zn همکاری دارند، زیرکلاس‌های متفاوتی از پروتئین‌های انگشت روی وجود دارد. برای مثال، در TFIIIA دو سیستئین و دو هیستیدین در متناسب-سازی اتصال Zn همکاری دارند و جزء کلاس C2H2 است، در حالی که فاکتورهای رونویسی گیرنده هورمون استروئیدی از چهار Cys برای هر Zn استفاده می‌کنند و جزء کلاس C4 هستند. موتیف انگشت روی در شیار بزرگ DNA به شکل اختصاصی-توالی اتصال می‌یابد که توسط یک مارپیچ آلفا در یک سمت ناحیه انگشت وساطت می‌گردد. همان‌طور که در مورد پروتئین‌های HLH دیده شد، مارپیچ α در شیار بزرگ جا شده و برای اتصال توالی-اختصاصی، زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه پیوندهای هیدروژنی را با بازها تشکیل می‌دهند (ص ۴۴۱).

دو کلاس پروتئین‌های انگشت روی جایگاه‌های اتصالی دارند که مشخصه نحوه

1. Homodomain proteins 2. Homeosis 3. Recognition helix 4. Coordination

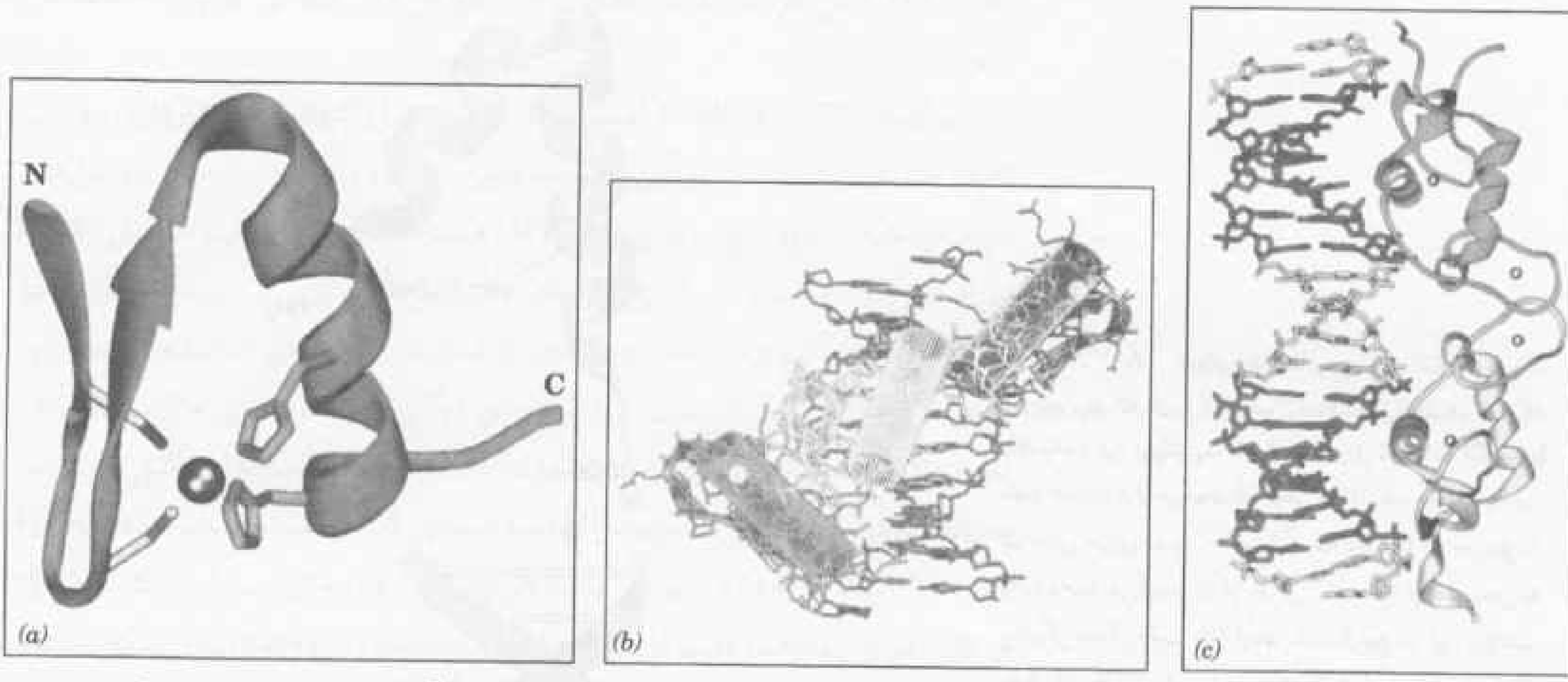


شکل ۲۴-۸ پروتئین‌های ماریپچ - پیچ - ماریپچ از یک ماریپچ برای اتصال به شیار اصلی استفاده می‌کنند، در حالی‌که باقیمانده این پروتئین‌ها اتصال از طریق تعاملات آبگریز را مورد حمایت قرار می‌دهد. (a) دومن HTH یک پروتئین به‌طور شاخص حاوی حدود ۲۰ اسید آمینه است که دو ماریپچ α را به وجود می‌آورند که از طریق یک پیچ غیرماریپچی به یکدیگر اتصال دارند. (b) ابعاد یک ماریپچ α این پروتئین به آن این امکان را می‌دهد تا در شیار اصلی ماریپچ DNA قرار گیرد. ماریپچی که مستقیماً با DNA تعامل می‌کند (ماریپچ شناسایی) شامل اسیدهای آمینه‌ای با زنجیرهای جانبی هستند که قادر به ایجاد پیوندهای هیدروژنی با بازهای اختصاصی می‌باشند که در شیار اصلی در معرض قرار دارند. ماریپچ دوم مستقیماً با DNA در تعامل نیست، ولی اتصال ماریپچ شناسایی را از طریق تعاملات آبگریز تثبیت می‌کند. لذا هر دو ماریپچ حاوی اسیدهای آمینه‌ای نظیر والین یا لوسین هستند که امکان انجام این تعاملات آبگریز را فراهم می‌سازند.

قرارگیری هر کلاس بر روی DNA می‌باشند. در مورد TFIIIA، انگشتان روی متوالی، شیار بزرگ را دنبال کرده و هر کدام از آنها پیوند هیدروژنی را با بازهای اختصاصی بوجود می‌آورند. پروتئین‌های انگشت روی کلاس C4، نظیر فاکتورهای رونویسی گیرنده هورمون استروئیدی، از یک انگشت روی برای اتصال به DNA و از انگشت روی دوم برای تثبیت اتصال اولی به DNA، استفاده می‌کنند. فاکتورهای رونویسی گیرنده هورمون استروئیدی به صورت دیمر به DNA اتصال می‌یابد. جایگاه‌های اتصالی اینها متشکل از دو «نیم - جایگاه» پالیندرومی است که به میزانی از یکدیگر فاصله دارند که دو انگشت روی اتصالی DNA دیمر در محل جا گیرند (شکل ۲۵-۸).

پروتئین‌های زیپ لوسینی - ناحیه بازی (bZIP) شامل fos، jun، و CREB می‌باشند. پروتئین‌های bZIP در هر موقعیت هفتم در ماریپچ α حاوی ریشه لوسین هستند. این لوسین‌ها تعاملات آبگریز با پروتئین دیگری ایجاد می‌کنند که آن نیز این الگوی تکرارهای لوسینی را برای تشکیل هُمو - یا هترودیمرها دارند (شکل ۲۶-۸).

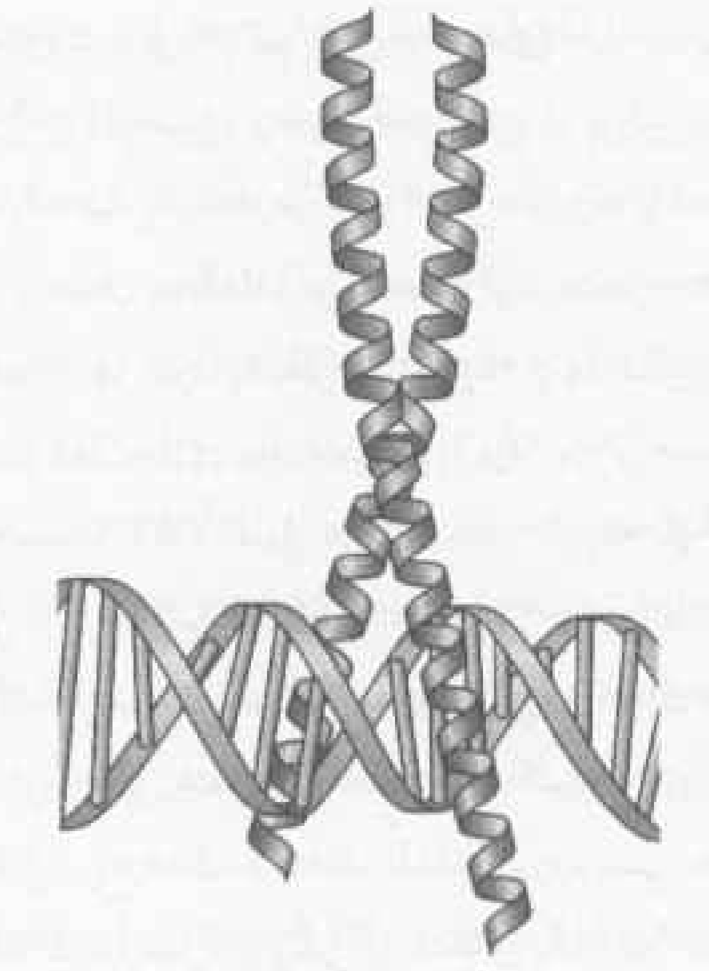
پروتئین‌های bZip یک دومن اتصالی DNA متشکل از یک ناحیه بازی دارند که با



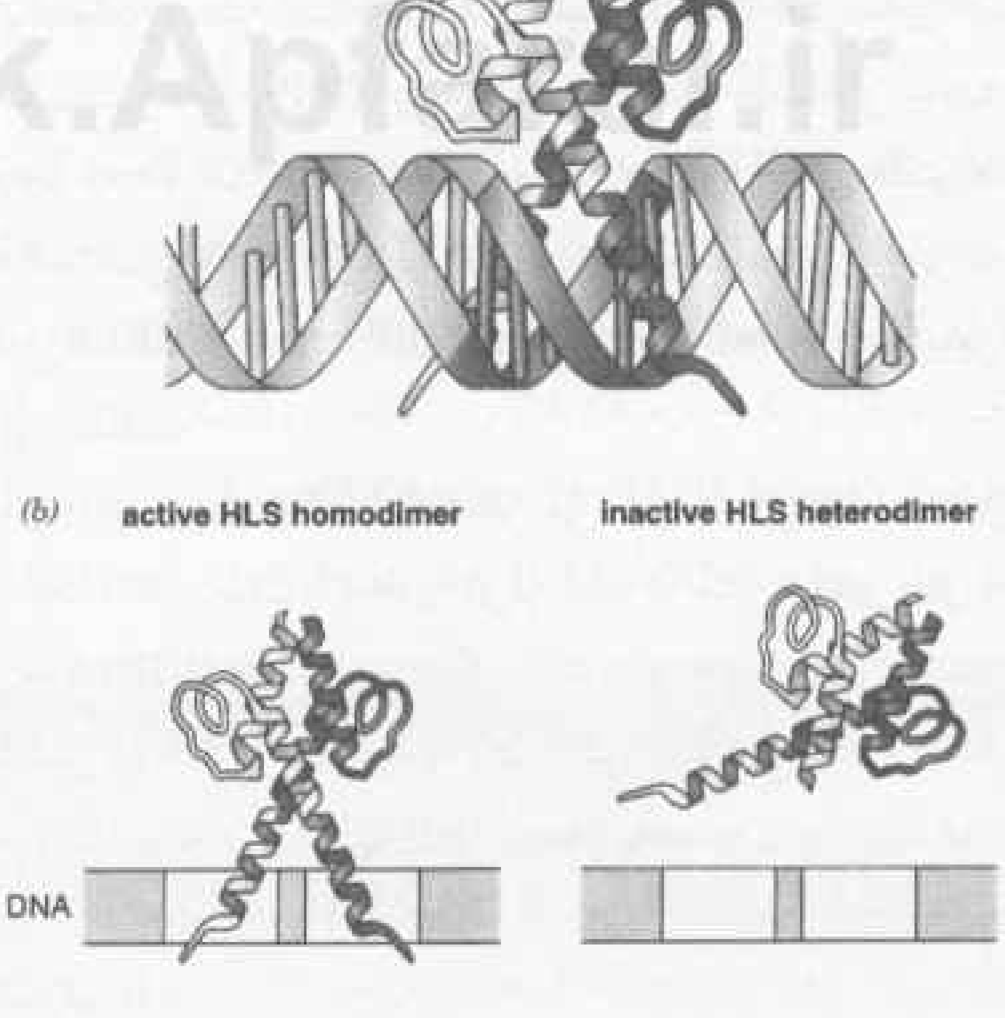
شکل ۲۵-۸ **دو موتیف انگشت Zn متفاوت در فاکتورهای رونویسی وجود دارد.** با وجود اینکه هر دو پروتئین انگشت Zn از یک اتصال کوئوردینانت یک ملکول Zn برای اتخاذ ساختمان نهایی خود استفاده می‌کنند، تفاوت‌های قابل‌مشاهده‌ای در این دو موتیف اصلی وجود دارد که مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. هر دو کلاس از مزیت تشکیل یک ساختمان مارپیچی α در ایجاد دومن‌هایی استفاده می‌کنند که به شیار اصلی DNA اتصال می‌یابد. (a) کلاس C2H2 شامل پروتئین‌هایی است که ممکن است دومن انگشت روی را داشته باشند. هر مارپیچ α یک انگشت روی تولید می‌کند که پتانسیل اتصال اختصاصی-توالی به جایگاه‌ها در طول شیار اصلی را دارند. نتیجه ممکن است ارتقاء تعاملات پروتئین DNA باشد که هر کدام وابسته به آرایشی از زنجیرهای جانبی اسید آمینه‌ای کوچک در هر دومن مارپیچ α پروتئین انگشت Zn می‌باشد. (b) کلاس Cx پروتئین‌های انگشت روی معمولاً دو دومن انگشت Zn دارد. مارپیچ α از یک انگشت روی Zn به DNA در شیار اصلی اتصال می‌یابد، در حالی‌که مارپیچ α موجود در انگشت Zn دیگر از تعامل دومن اتصالی به DNA از طریق تعاملات آبگریز حمایت می‌کند. کلاس Cx پروتئین‌های انگشت Zn به‌طور طبیعی از طریق تولید دیمر به DNA اتصال می‌یابند. در (c) تعامل دیمر گیرنده استروژن نشان داده شده است که در آن هر منومر با DNA در تماس است. ملکول‌های Zn به صورت کره نشان داده شده‌اند.

وجود آرژینین و لیزینی تعریف می‌شوند که هفت اسید آمینه قبل از اولین لوسین و مارپیچ α قرار دارد. علاوه بر تشکیل پیوندهای هیدروژنی در شیار بزرگ، این اسیدهای آمینه بازی از طریق تعاملات بازی با بارهای منفی اسکلت DNA، سبب تثبیت تعامل DNA- پروتئین می‌شوند. جایگاه‌های اتصالی هُمودیمر تقارن جفتی دارند، در حالی‌که این نوع تقارن در جایگاه‌های اتصالی هترودیمر یافت نمی‌شوند.

کلاس مارپیچ- قوس- مارپیچ فاکتورهای رونویسی شامل myoD، myc و max می‌باشند. دو قطعه مارپیچی α آمفی‌پاتیک توسط یک قوس مداخله‌گر از یکدیگر جدا شده‌اند که مشخصه پروتئین‌های مارپیچ ـ قوس ـ مارپیچ است. همانند حالت موجود در پروتئین‌های انگشت روی، این مارپیچ‌ها نقشی در اتصال به DNA ندارند ولی مسئول دیمریزاسیون با پروتئین دیگر هستند. همان‌طور که در مورد پروتئین‌های bZip اشاره شد، این دیمرها می‌توانند هُمو یا هترودیمر باشند. دومن اتصال به DNA، قسمت امتدادیافته‌ای از یکی از مارپیچ‌های α است که تولید دسته چهار ـ مارپیچی حاصل از دیمریزاسیون می‌کند (شکل ۲۷-۸).



شکل ۲۶-۸ پروتئین‌های زیپ لوسینی به صورت دیمر به DNA اتصال می‌یابند. پروتئین‌های زیپ لوسینی دیمرهایی را به‌وجود می‌آورند که یک لوسین در هر هفتمین ریشه در طول یک مارپیچ α آن وجود دارد. این لوسین‌ها یک سمت آبگریز به‌وجود می‌آورند که با سمت آبگریز یک مارپیچ α مشابه تعامل می‌کنند. دومن‌های تعامل پروتئین - پروتئین آبی هستند. نواحی مارپیچی α ممکن است به بعد از دومن تعامل پروتئین - پروتئین ادامه یافته و امکان اتصال هر منومر به شیار اصلی DNA را فراهم کنند (سبز). برای هُمودیمرها، جایگاه اتصالی DNA توسط دو نیم - جایگاه قابل‌شناسایی و متقارن مشخص می‌شود.



شکل ۲۷-۸ تولید دیمر فاکتور رونویسی از طریق تعاملات مارپیچ - قوس - مارپیچ وساطت می‌گردد. موتیف مارپیچ - قوس - مارپیچ دو منومر را در کنار یکدیگر قرار داده تا تولید دیمری کند که به DNA اتصال می‌یابد. (a) هر منومر دو مارپیچ دارد که توسط یک قوس به یکدیگر متصل هستند. یک مارپیچ برای تعامل پروتئین - پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ مارپیچ دیگر برای اتصال به شیار بزرگ DNA به‌کار می‌رود. لذا این دیمر متشکل از یک دسته چهار - مارپیچی است. در صورتی‌که این دیمر توسط دو منومر یکسان تشکیل شود، آنگاه انتظار می‌رود جایگاه‌های اتصالی DNA بسیار مشابه یا یکسان باشند؛ هر چند، در صورتی‌که منومرها پروتئین‌های متفاوتی باشند (تولید هترودیمر کنند)، آنگاه این جایگاه‌های اتصالی DNA ممکن است غیرمرتبط باشند. (b) وقتی فاکتورهای رونویسی به صورت دیمر اتصال می‌یابند، وجود یک منومر ناقص می‌تواند حتی در حضور منومرهای با طول - کامل، مانع اتصال به DNA شود. برای مثال، در صورتی‌که مارپیچ دیمرزاسیون پروتئین بدون دومن اتصالی DNA ساخته شود، دیمرزاسیون با منومر طول - کامل سبب تولید محصولی خواهد شد که قادر به اتصال مؤثر به DNA نیست.

۹-۸ • تنظیم بیان ژن در اوکاریوت‌ها

همان‌طور که در بالا مورد اشاره قرار گرفت، ممکن است اتصال اختصاصی - توالی به DNA توسط ناحیه کوچکی از یک پروتئین تنظیم‌کننده تعیین گردد، در حالی‌که دومن‌های دیگر در تعاملات پروتئین - پروتئین یا لیگاند دخالت دارند. چندین دومن فعال‌سازی

مشخص، شامل دومن‌های اسیدی (تراکم بالای اسیدهای آمینه دارای زنجیرهای جانبی اسیدی)، دومن‌های غنی از گلوتامین، و دومن‌های غنی از پرولین، مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. به‌طور تجربی، تولید بیش از حد هر کدام از این دومن‌ها با استفاده از تکنیک‌های نوترکیبی، حتی بدون دومن اتصال به DNA مربوطه، می‌تواند منجر به فعال‌سازی نامناسب رونویسی از انواع مختلف ژن‌ها شود. به نظر می‌رسد که اینها با افزایش سرعت همایش کمپلکس قبل‌شروع سبب فعال‌سازی رونویسی می‌شوند. برخی مستقیماً با TFIID در جهت تسهیل اتصال به جعبه TATA تعامل می‌کنند، در حالی‌که بقیه با TFIIB یا TAFs تعامل می‌کنند که قسمتی از کمپلکس TFIID است. وقتی چندین فاکتور رونویسی به یک پروموتر اتصال می‌یابد، آنها می‌توانند یک اثر جمعی بر روی اتصال و همایش کمپلکس قبل‌شروع داشته باشند. دومن‌های همایش بسیاری از فاکتورهای رونویسی، پروتئین‌های یکسانی را در کمپلکس قبل‌شروع هدف گرفته‌اند. لذا تنظیم رونویسی به قرارگیری جایگاه‌های اتصالی DNA و نه تعاملات پروتئین - پروتئین بی‌همتای یک ژن اختصاصی ارتباط دارد.

فاکتورهای رونویسی همچنین می‌توانند بیان ژن را با فراخوانی پروتئین‌های دیگر به ناحیه پروموتری تنظیم کنند. این پروتئین‌ها ممکن است به DNA اتصال پیدا نکرده و در عوض پلی را بین فاکتور رونویسی متصل به DNA و کمپلکس شروع برقرار کنند. به‌طریق دیگر، پروتئین تعاملگر ممکن است آنزیم‌های تغییردهنده کروماتین، نظیر هیستون استیلاز (برای مثال، کمپلکس CBP-p300) را به سمت ژن‌های اختصاصی بیاورد. استیلاسیون هیستون‌ها منجر به شل‌شدن ساختمان کروماتین می‌شود. برخی فاکتورهای رونویسی تنظیم‌شده که کمپلکس CBP-p300 را فرا می‌خوانند و ملکول‌ها و حوادثی که به آنها پاسخ می‌دهند، شامل CREB و cAMP، SREBP و کلسترول، NFκB و سیتوکین‌ها، و p53 و توقف رشد می‌باشند.

فاکتورهای رونویسی که بیان ژن را کاهش می‌دهند، ممکن است از قبل، یا به همان توالی به‌عنوان یک فاکتور مثبت یا به‌طور کلی‌تر، نظیر اثر منفی پروتئین‌های اتصالی DNA متیله، متصل به DNA باشند. به‌طریق دیگر، فاکتورهای منفی ممکن است مانع اتصال یا همایش کمپلکس قبل‌شروع شده و یا به یک فاکتور رونویسی مثبت اتصال‌یافته تا مانع اتصال آن به DNA شده و یا تجزیه آن را سرعت بخشد.

تنظیم تنظیم‌گرها

فاکتورهای رونویسی به طرق مختلفی تنظیم می‌شوند. احتمالاً ساده‌ترین نمونه‌ها مربوط به آنهایی است که تنها در سلول‌های تخصص‌یافته یا در زمان‌های خاص نمو سنتز می‌شوند. برخی از طریق اتصال کوفاکتور تنظیم می‌شوند که ممکن است اتصال آنها به DNA را مهار یا تحریک کنند. برای فاکتورهای رونویسی که ایجاد دیمر می‌کنند، تولید کمپلکس‌های هُمو- یا هترودیمر غیرمؤثر می‌تواند اتصال به DNA یا تعاملات پروتئین - پروتئینی را تغییر دهند

که امکان فعال‌سازی ژن را فراهم می‌سازند. تغییر بعد از ترجمه، نظیر پردازش پروتئین یا فسفریلاسیون، ممکن است بر روی اتصال فاکتور رونویسی به DNA یا پروتئین‌های دیگر و توانایی آنها در حرکت از سیتوپلاسم به هسته تأثیر بگذارد (ارتباطات بالینی ۴-۸ و ۵-۸).

از آنجایی که فزاینده‌ها می‌توانند در فواصل طولانی عمل کنند، لازم است راهی برای تضمین عمل آنها بر روی ژن صحیح وجود داشته باشد. این مهم با استفاده از توالی‌های عایقی به انجام می‌رسد که مرزهایی را در برای اثر یک فزاینده به‌وجود می‌آورند. عایق‌ها توالی‌هایی از DNA هستند که وقتی به پروتئین انگشت روی CCTF (فاکتور اتصالی CCCTC) اتصال می‌یابند و در بین یک فزاینده و جعبه TATA قرار می‌گیرند، مانع فعال‌سازی ژنی به‌واسطه فزاینده می‌شوند. فعالیت دیگر عایق‌ها در جلوگیری از انتشار هتروکروماتینی است که منجر به خاموش‌سازی ژن می‌گردد.

فعال‌سازی رونویسی ژن گیرنده LDL بسیاری از خصوصیاتی موجود در تنظیم ژن اوکاریوتی را تشریح می‌کند

تشریح تنظیم بیان ژن‌های اوکاریوتی اختصاصی را می‌توان به یک سوپ الفبایی از فاکتورهای رونویسی و تنظیم‌کننده‌های فاکتورهای رونویسی تشبیه نمود که سبب درک محققین از مطالعه ژن می‌شود، ولی برای بیشتر افراد دیگر گیج‌کننده می‌باشد. بسیاری از خصوصیات فاکتورهای رونویسی که در بالا به آنها اشاره شد را می‌توان با کنترل رونویسی ژن گیرنده لیپو-پروتئین با چگالی پایین (LDL) شرح داد. این ژن در پاسخ به کمبود کلسترول سلولی رونویسی می‌شود. افزایش این رونویسی همراه با افزایش میزان گیرنده LDL و افزایش برداشت LDL و کلسترول آنها از گردش خون می‌باشد (ص ۹۷۹).

پروموتر گیرنده LDL یک جعبه TATA و جایگاه‌های اتصالی برای انواع مختلفی از فاکتورهای رونویسی دارد (شکل ۲۸-۸). جعبه TATA محلی برای اتصال TFIID و ایجاد کمپلکس قبل شروع با RNA پلیمراز II دارد. سه جایگاه اتصالی مشترک برای فاکتور

ارتباط بالینی ۴-۸

تاموکسیفن و هدف‌گیری گیرنده استروژن

تاموکسیفن[1] که به عنوان یک دارو در درمان سرطان پستان مورد استفاده قرار می‌گیرد، یک مهارکننده رقابتی گیرنده استروژن[2] (ER) است. سلول‌های سرطانی پستان با افزایش میزان تکثیر خود، به استروژن طبیعی پاسخ می‌دهند. استروژن گیرنده استروژن را فعال می‌کند، در حالی که تاموکسیفن مانع این فعال‌سازی شده و با کاهش رونویسی ژن‌های تحت تنظیم گیرنده استروژن سبب کاهش رشد سلول‌های سرطانی پستان می‌گردد. مؤسسه ملی سرطان در سال ۲۰۰۴ عنوان نمود، «فواید تاموکسیفن در درمان سرطان پستان به خوبی تعیین شده است و به مراتب بیش از خطرات آن است.» هرچند، درمان با تاموکسیفن می‌تواند خطر سرطان رحم را افزایش دهد. علت این موضوع در وجود دو زیر نوع گیرنده برای استروژن (α و β) می‌باشد که هر دو در بافت پستان وجود دارند، ولی گیرنده α در بافت رحم غالب است. در رحم تاموکسیفن واضحاً گیرنده β را فعال نموده و آن را مهار نمی‌کند. نتیجه تحریک رونویسی مرتبط با فاکتورهای رونویسی fos و Jun می‌باشد.

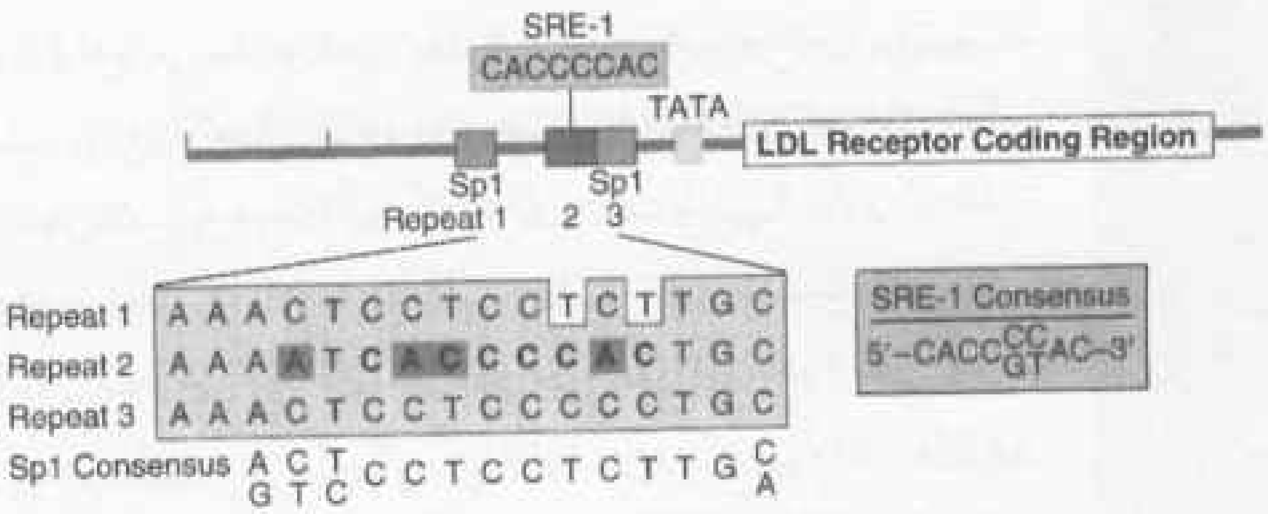
1. Tamoxifen
2. Estrogen receptor

ارتباط بالینی ۵-۸

فاکتورهای رونویسی و بیماری قلبی- عروقی

در میان ژن‌هایی که اخیراً به‌عنوان عامل ایجادکننده بیماری قلبی - عروقی انسان مورد شناسایی قرار گرفته‌اند، دو مورد فاکتورهای رونویسی را کد می‌کنند. یکی از اینها Nkx2-5 می‌باشد که یک پروتئین حاوی هُمودومن است. پروتئین‌های هُمودومن اغلب در تنظیم سرنوشت سلول در سلول‌های رویانی نقش دارند و Nkx2-5 ژن‌های درگیر در تشکیل قلب را تنظیم می‌کند. جهش‌های رخ داده در یک آلل Nkx2-5 با نقص‌های دیواره دهلیزی و نقص‌های هدایتی ارتباط دارند. جهش پوچ[1] در موش خانگی سبب مرگ رویان می‌شود. جهش‌های مربوط به ژن دیگر، یعنی Tbx، مسئول سندروم هالت-اورام[2] می‌باشند. این سندروم اغلب شامل نقص‌های دیواره دهلیز[3] (ASD)، نقص‌های دیواره بطن[4] (VSD)، نقص‌های هدایتی[5] و نقص‌هایی در نمو دست و بازو می‌باشد.

1. Null mutation
2. Holt-Oram syndrome
3. Atrial septal defects
4. Ventricular septal defects
5. Conduction defects

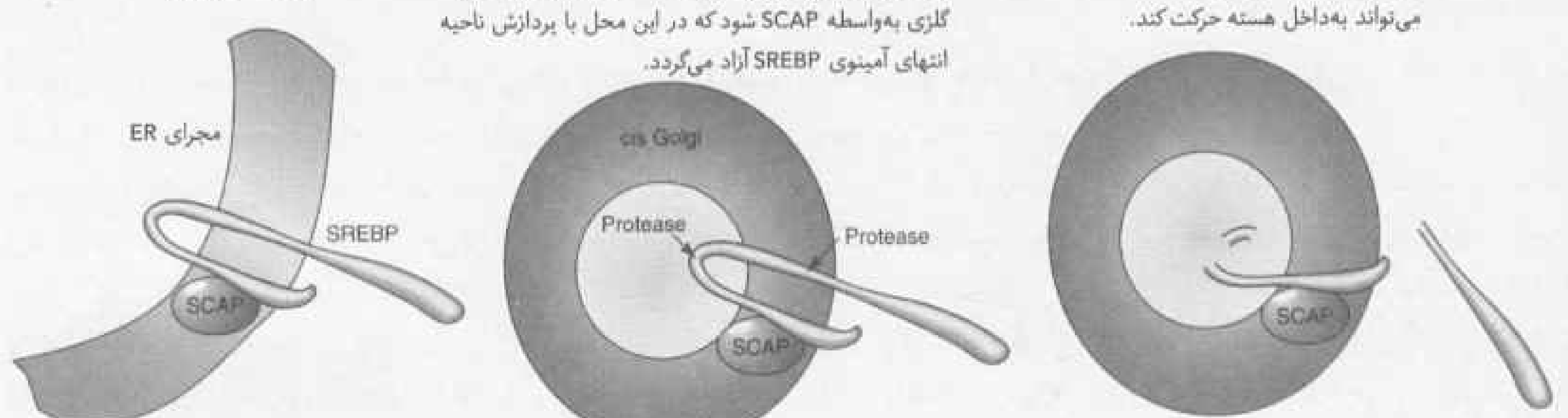


شکل ۲۸-۸ طرحی از پروموتر ژن گیرنده LDL. پروموتر ژن گیرنده LDL، همانند اکثر ژن‌های اوکاریوتی، چندین جایگاه اتصال به فاکتور رونویسی مختلف دارد. در اینجا جایگاه‌های اصلی درگیر در تنظیم ژن گیرنده LDL در پاسخ به مقادیر کلسترول نشان داده شده‌اند. اینـها شامل جعبه TATA، درست در فرادست جایگاه شروع رونویسی، چندین جعبه GC (جایگاه‌های اتصالی SP-1) و عنصر پاسخ (SRE) برای اتصال SREBP می‌باشند.

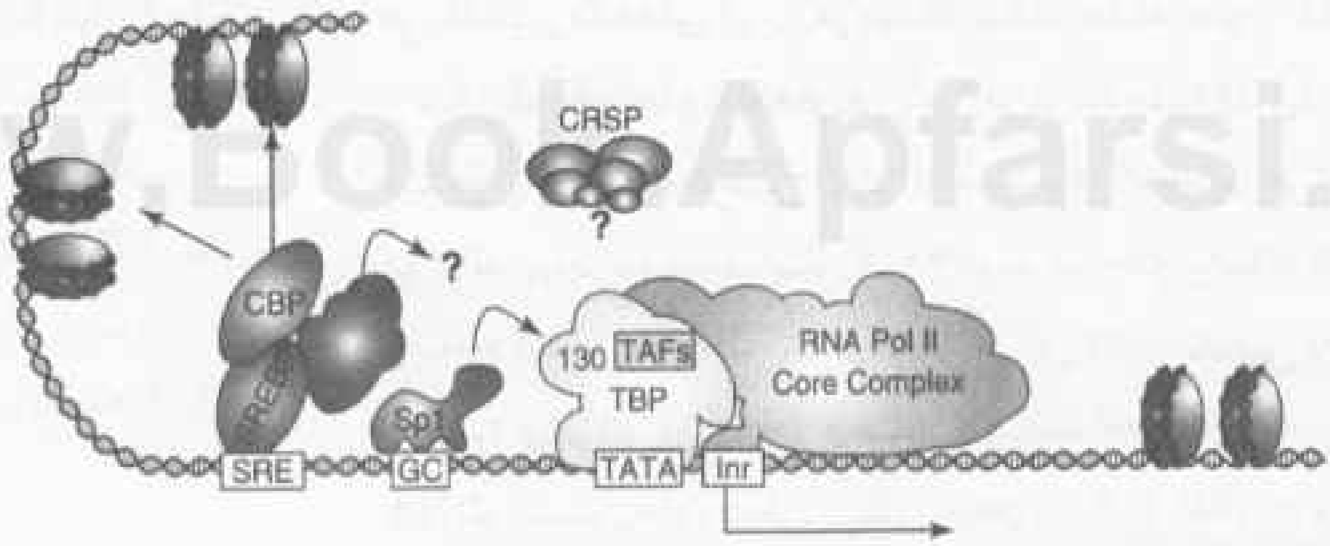
رونویسی حاوی انگشت روی Sp1 وجود دارد (بیاد داشته باشید که Sp1 به جعبه‌های GC در پروموتر اتصال می‌یابد). این فراخوانی نیاز به فاکتور دیگری به‌نام فاکتور مورد نیاز برای فعال‌سازی Sp1 (CRSP)[1] دارد. هر چند، اتصال Sp1 برای فعال‌سازی رونویسی این ژن کافی نیست. فعال‌سازی نیاز به همکاری فاکتور رونویسی دیگری به‌نام پروتئین اتصالی عنصر پاسخ به استرول 1a (SREBP-1a)[2] دارد. SREBP-1a یک پروتئین زیپ لوسینی مارپیچ-قوس-مارپیچ است که به عنصر پاسخ استرولی موجود در بین جایگاه‌های اتصالی Sp1 در ژن گیرنده LDL اتصال می‌یابد.

ظرفیت پاسخ‌دهی به غلظت کلسترول تحت کنترل آزادسازی SREBP از وضعیت متصل به غشاء قرار دارد که مانع انتقال آن به داخل هسته می‌شود. SREBP-1a دو دومن دارد که با عبور از غشاء شبکه آندوپلاسمی (ER) ایجاد یک قوس کرده و دومن دارای قابلیت عمل به‌عنوان فاکتور رونویسی را در معرض سیتوپلاسم، ولی متصل به ER نگه می‌دارد. برای انتقال SREBP-1a به داخل هسته، لازم است این پروتئین طی دو مرحله پروتئولیتیک تجزیه گردد که اولی آنها توسط پروتئازی انجام می‌شود که به شکل فعال در یک بخش بعد از ER، تحت عنوان سیس-گلژی قرار دارد. انتقال SREBP-1a به سیس-گلژی نیاز به پروتئین فعال‌کننده تجزیه SREBP (SCAP)[3] دارد که آن هم نیز تا حدودی در داخل غشاء ER فرو رفته است. SCAP یک ناحیه حس‌کننده کلسترول دارد و وقتی میزان کلسترول غشایی پایین است، SCAP-SREBP-1a به سیس-گلژی انتقال یافته و در آنجا پروتئولیز SRCBP-1a رخ می‌دهد که نتیجه آن آزادسازی دومن سیتوپلاسمی یا فاکتور رونویسی برای ورود به هسته می‌باشد (شکل ۲۹-۸). این فاکتور رونویسی در این محل به عنصر پاسخ به استروئید (SRE) موجود در پروموتر LDL اتصال یافته و یک هیستون استیل ترانسفراز به‌نام CBP و پروتئین‌های دیگر را به این ناحیه پروموتری فرا می‌خواند. سپس با همکاری Sp1 و CRSP، ژن گیرنده LDL رونویسی می‌شود (شکل ۳۰-۸). این مثال ماهیت مرکب

1. Cofactor required for Sp1 activation
2. Sterol responsive element-binding protein 1a
3. SREBP cleavage activating protein



شکل ۸-۲۹ **SREBP به‌واسطه فعالیت پروتئازی از پیش‌ساز متصل به غشاء آزاد می‌گردد.** (a) پروتئین اتصالی به عنصر پاسخ استرولی (SREBP) به‌عنوان یک پروتئین پیش‌ساز سنتز می‌شود که قبل از عمل به‌عنوان یک فاکتور رونویسی می‌بایست به‌طریق پروتئولیتیک پردازش شود. این پیش‌ساز به‌واسطه دو ناحیه عبورکننده از عرض غشاء، متصل به غشاء ER می‌باشد. این پیش‌ساز در نزدیکی پروتئین تجزیه - فعال‌کننده SREBP (SCAP) قرار دارد. ولی وقتی میزان کلسترول غشاء ER طبیعی است، به‌صورت پردازش‌نشده باقی می‌ماند. (b) SCAP مقادیر پایین کلسترول را احساس نموده و SREBP را به سیس - گلژی انتقال می‌دهد تا در آنجا با دو فعالیت پروتئازی مختلف SREBP شکسته شده و بنابراین (c) دومن سیتوپلاسمی بتواند به هسته انتقال یابد. بدین‌ترتیب SREBP ژن گیرنده LDL را فعال نمی‌کند، مگر این که میزان کلسترول پایین باشد.



شکل ۸-۳۰ **ژن گیرنده LDL از طریق اثر هماهنگ چندین فاکتور رونویسی فعال می‌شود.** فعال‌سازی ژن گیرنده LDL نیاز به چندین فاکتور دارد. وقتی SREBP، Sp1 و کوفاکتور مورد نیاز برای فعال‌سازی Sp1 (CRSP) اتصال می‌یابند، CBP به ناحیه پروموتری فراخوانده می‌شود. این ترکیب فاکتورها، پیام مثبتی را فراهم می‌سازد که برای افزایش اتصال کمپلکس شروع به جعبه TATA لازم است، و از طریق فراخوانی CBP که فعالیت هیستون استیل‌ترانسفرازی دارد، بر روی ساختمان کروماتینی مجاور نیز تأثیر می‌گذارد.

تنظیم ژن اوکاریوتی را نشان می‌دهد که در آن فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی، هماهنگی فاکتورهای رونویسی متعدد و فراخوانی آنزیم‌های بازسازی، هماهنگ با یکدیگر بیان ژن را تنظیم می‌کنند.

کنترل اپی‌ژنتیکی بیان ژن

فاکتورهای رونویسی که در بالا به آنها پرداخته شد، بیان ژن را از طریق تعامل با توالی‌های اختصاصی DNA تنظیم می‌کنند. هرچند، همان‌طور که قبلاً در این فصل اشاره شد، دسترسی به DNA می‌تواند یک تنظیم‌کننده بیان ژن با قدرت برابر باشد. تعدیل ساختمان کروماتین از طریق ایجاد تغییرات هیستونی، بازسازی نوکلئوزومی، یا تغییر DNA با متیلاسیون را می‌توان

ارتباط بالینی ۶-۸

درمان سرطان با استفاده از داروهایی که هدف آنها تغییر هیستون و DNA است: درمان اپی‌ژنتیکی

هم متیلاسیون DNA و هم تغییر هیستون بر روی بیان ژن تأثیر می‌گذارد. برای مثال، متیلاسیون DNA به‌طور طبیعی همراه با کاهش بیان ژن است، و در برخی هیپرمتیلاسیون DNA در نواحی پروموتری ژن‌های فرونشاننده تومور یافت شده است. متیلاسیون DNA که توسط DNA متیل‌ترانسفراز (DNMT) انجام می‌شود را می‌توان توسط ۵-آزاسیتیدین [1] و آنالوگ‌های نوکلئوزیدی مربوطه مهار نمود. چندین مورد از این ترکیبات برای درمان سندروم میودیس‌پلاستیک و لوسمی مورد تأیید FDA قرار گرفته‌اند. آنالوگ‌های نوکلئوزیدی دیگر و آنالوگ‌های نوکلئوتیدی که DNMTها را مهار می‌کنند، تحت بررسی قرار دارند.

مهارکننده‌های هیستون داستیلاز (HDAC) نیز با هدف تحریک مجدد بیان ژن فرونشاننده تومور از طریق حفظ استیلاسیون و بازتر کردن ساختمان کروماتین، تحت بررسی قرار دارند. ورینوستات [2] به‌عنوان مهارکننده HDAC برای درمان لنفوم سلول T پوستی مورد تأیید FDA قرار گرفته است.

استفاده از این مهارکننده‌ها، به صورت مجزا یا به عنوان قسمتی از درمان همراه با سایر درمان‌های سرطانی، بسیار امیدبخش می‌باشد.

1. 5- Azacytidine 2. Vorinostat

به عنوان تنظیم غیروابسته به توالی بیان ژن در نظر گرفت. تنظیم بیان ژن غیروابسته به بیان ژن را اغلب کنترل اپی‌ژنتیکی [1] گویند (ارتباط بالینی ۶-۸).

بسیاری از تغییرات بعد از ترجمه‌ای که بر روی هیستون‌ها انجام می‌شوند، شناخته‌شده می‌باشند. ریشه‌های لیزین می‌توانند استیله، متیله (منو-، دی-، و تری‌متیله) اوبی‌کوییتینه و ساموئیله [2] شوند. ریشه‌های آرژینین می‌توانند متیله (منو- یا دی‌متیله) یا دایمینه [3] (تولید سیترولین)، سرین و ترئونین می‌توانند فسفریله، گلوتامات می‌تواند ADP-ریبوزیله و پرولین می‌تواند ایزومریزه شوند. بیش از ۶۰ آنزیم شناخته شده‌اند که می‌توانند تغییرات هیستونی را انجام داده و یا حذف کنند و برخی از این تغییرات، ولی نه تمامی آنها، با فعال‌سازی یا سرکوب بیان ژن در ارتباط هستند. تغییرات اختصاصی می‌توانند پیوستن هیستون‌ها به DNA، هیستون‌های دیگر، نوکلئوزوم‌های دیگر و فاکتورهای رونویسی را تحت تأثیر قرار دهند. شواهد در حال ظهوری مبنی بر نقش ملکول‌های RNA کوچک اختصاصی در وراثت پایدار الگوهای تغییر هیستونی در هنگام اتخاذ یک الگو وجود دارد.

واژه‌های کلیدی

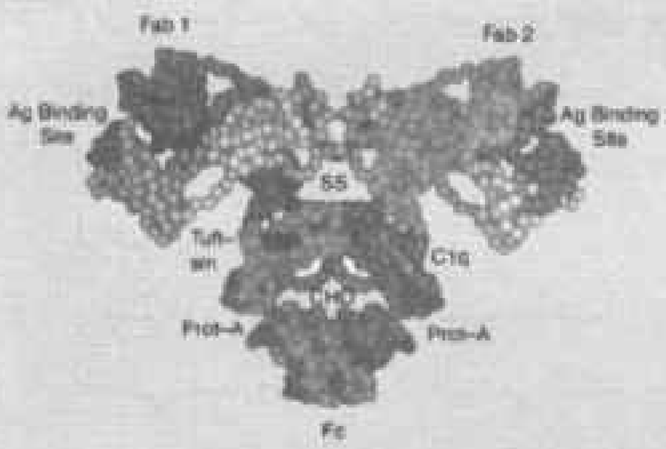
اپرون	تضعیف	متیلاسیون	موتیف‌های اتصالی DNA
القاءکننده	پلی‌سیسترونی	استیلاسیون	اپی‌ژنتیک
سرکوبگر	کروماتین	فسفریلاسیون	عناصر پاسخ
کمک سرکوبگر	نوکلئوزوم‌ها	شیار اصلی	توالی رهبر
عنصر کنترلی	ناحیه رابط	شیار فرعی	زیپ لوسینی
رونویسی	پروموتر	فزاینده	ماریپچ-قوس ماریپچ
RNA پلیمراز	فاکتور رونویسی	هیستون	ماریپچ-پیچ-ماریپچ

1. Epigenetic 2. Sumoylated 3. Deiminated



بخش ۳
عملکرد پروتئین‌ها

۹



پروتئین‌ها II: ارتباطات ساختمان- عملکرد در خانواده‌های پروتئینی

مفاهیم کلیدی

ایمونوگلبولین‌ها

- ملکول‌های ایمونوگلبولین حاوی توالی‌های هُمولوگوس تکراری هستند که فولدهای ایمونوگلبولینی متعددی را در داخل زنجیرهای سبک (L) و سنگین (H) ساختمان پایه چهار پلی‌پپتیدی $2(LH)$ به‌وجود می‌آورند.
- فولدهای ایمونوگلبولینی از زنجیرهای مختلف به یکدیگر پیوسته و تولید دومن‌هایی می‌کنند که در اتصال به آنتی‌ژن، فعال‌سازی کمپلمان، تسریع پلیمریزاسیون در کلاس‌های آنتی‌بادی خاص فعالیت دارند.
- دومن‌های انتهای آمینو از زنجیرهای L و H (دومن‌های $V_H - V_L$)، یک ناحیه قوس فوق‌متغیر دارند که به آنتی‌ژن هدف اختصاصی آن آنتی‌بادی اتصال می‌یابند.
- فولد ایمونوگلبولینی یک سوپرفولد است که در انواع مختلف وسیعی از ملکول‌هایی با توالی و عملکرد غیرهُمولوگوس تشکیل می‌شود.

سرین پروتئازها

- سرین پروتئازها به‌صورت یک مکانیسم کاتالیتیکی مشترک با ریشه‌های اسیدآمینه یکسان تعریف می‌شوند که برای کاتالیز ضروری هستند.

- سرین پروتئازهای تریپسین- مانند دو فولد لوله $\beta-$ متشکل از واحد کاتالیتیک با ریشه‌های جایگاه فعال در شکاف بین دومنی دارند. طی تکامل همگرا، خانواده‌های دیگر سرین پروتئازها با یک ساختمان سوم غیر هُمولوگوس، ولی با مکانیسم کاتالیتیکی یکسان با پروتئازهای موجود در خانواده تریپسین- مانند، به‌وجود آمده‌اند.
- ویژگی سوبسترایی برای سوبستراهای فیزیولوژیک مختلف در میان پروتئازهای خانواده تریپسینی، توسط نواحی قوسی ساختمان‌های تاشده‌ای تعیین می‌شود که تعاملات جایگاه دوم به سوبستراهای پلی‌پپتیدی را فراهم می‌سازند.
- پروتئازها واکنش‌ها را با تثبیت ساختمان چهاروجهی و اکسی‌آنیون حالت انتقالی هیدرولیتیک، کاتالیز می‌کنند.
- سرین پروتئازها اغلب به‌صورت زیموژن سنتزشده، توسط یک پروتئاز فرادست در یک آبشار آنزیمی فعال می‌شوند، و توسط مهارکننده‌های پروتئینی تحت عنوان سرپین‌ها مهار می‌گردند.

هموگلوبین و میوگلوبین

- زنجیرهای هموگلوبین و میوگلوبین ساختمان‌های تاشده یکسانی دارند.
- یک گروه پروستتیک هِم قسمتی از جایگاه اتصال به O_2 در زنجیرهای گلوبینی هموگلوبین و میوگلوبین می‌باشد.
- هموگلوبین ساختمان چهارمی با چهار واحد هِم دارد که به‌واسطه تغییرات کونفورماسیونی زیرواحدی که از یک جایگاه هِمی به جایگاه‌های هِمی دیگر موجود در داخل این ساختمان چهارم انتقال می‌یابد، با همکاری تعاونی مثبت به اکسیژن اتصال می‌یابد.
- پروتون‌ها و ملکول‌های ۲ و ۳- بیس‌فسفوگلیسرات که در هنگام تغییر از کونفورماسیون داکسی به اکسی از هموگلوبین جدا می‌شوند، تعادل اتصال- جدایی اکسیژن را از طریق تغییر در غلظت آنها تنظیم می‌کنند.
- هموگلوبین با تبدیل به کونفورماسیون داکسی، NO را برای تحویل به دیواره مویرگی پنهان می کند.

ساختمان لامینای پایه

- لامینای پایه یک کمپلکس ساختمانی متشکل از چندین زیرواحد پروتئینی همراه با هسته تعاملگر متشکل از کلاژن نوع IV، لامینین، نیدوژن/ انتاکتین، و پرلکان هپاران سولفات می‌باشد.
- پروتئین‌های لامینای پایه با ایزوفرم‌های مختلف وجود دارندو ایزوفرم‌های بیان‌شده در یک بافت خاص مختص بافتی هستند که غشاء پایه مرتبط با آن را سنتز می‌کند.
- لامینین و کلاژن نوع IV به‌طور خودبه‌خودی پلیمریزه شده تا تولید شبکه‌های ملکولی مشخص با جایگاه‌های اتصالی برای کوپروتئین‌ها و برای پروتئین های گیرنده سلول کنند.
- لامینین لامینای پایه به اسکلت سلولی داخل سلولی سلول‌های مرزی در جایگاه‌های گیرنده چسبندگی کانونی موجود در غشاءهای پلاسمایی متصل است.

۹-۱ • مقدمه

در فصل ۳ به پایه‌های معماری پروتئین اشاره شد. در این فصل با بررسی توالی اسید آمینه‌ای، سازماندهی ساختمانی و عملکرد بیولوژیکی، به بحث پیرامون ارتباطات بین ساختمان و عملکرد در سه **خانواده پروتئینی** می‌پردازیم: ایمونوگلبولین‌ها، سرین پروتئازها، و هموگلوبین. همچنین به سازماندهی پروتئین‌ها در ایجاد غشاء پایه ماتریکس خارج سلولی احاطه‌کننده سلول‌ها و بافت‌ها اشاره می‌شود.

ایمونوگلبولین‌ها مثال‌هایی از معماری هستند که سازماندهی و اتصال به ملکول‌های خارجی را وساطت می‌کنند و منجر به پنهان‌سازی آنها می‌شوند. تنوع موجود در بین اعضاء خانواده، منبع شناسایی اختصاصی قابلیت‌های ملکولی و اتصالی مجزا می‌باشد.

سرین پروتئازها مثال‌هایی از آنزیم‌ها را فراهم می‌سازند که به نظر می‌رسد که طی دوره تکامل از یکدیگر دور شده‌اند تا فعالیت‌های فیزیولوژیکی بی‌همتایی را، اغلب در آبشارهای آنزیمی سازماندهی‌شده، انجام دهند. شباهت‌های موجود در مکانیسم‌های کاتالیتیک و ساختمان‌های سه- بُعدی آنها، یک ارتباط مشترک را ایجاد می‌کند.

هموگلوبین‌ها مثال‌هایی از پروتئین‌های با تنظیم بسیار ظریف هستند که به‌طور همزمان فعالیت‌های فیزیولوژیکی شدیداً تنظیم‌شده متعددی را کاتالیز می‌کنند. اینها می‌توانند جایگزینی‌ها یا جهش‌های زیادی را داشته باشند که بسیاری از آنها مسائل بالینی را به‌دنبال دارند و همچنان فعالیت‌های فیزیولوژیک خود را به انجام می‌رسانند. این پروتئین‌ها تنوع جایگزینی‌ها در توالی اسید آمینه‌ای را آشکار می‌سازند که می‌توانند از نظر ساختمانی تحمل شده و امکان فعالیت پروتئین را فراهم سازند. هموگلوبین در سطح اتمی نشان می‌دهد که چرا یک پروتئین فعالیت‌های فیزیولوژیکی متعددی را به شکل تحت تنظیم انجام می‌دهد.

غشاء پایه[1] یک کمپلکس پروتئینی خارج‌سلولی است که از پروتئین‌های ترشح‌شده سلولی تشکیل می‌شود که به یکدیگر اتصال یافته تا یک شبکه ملکولی در فضای خارج سلولی را به‌وجود آورند که مرزها و محیط تنظیمی سلول‌ها و بافت‌ها را فراهم می‌سازند. این غشاء مثالی از یک شبکه پیچیده متشکل از زیرواحدهای پروتئینی مختلف است که به‌طور خود به‌خودی به صورت یک آرایش ملکولی اختصاصی به یکدیگر می‌پیوندند. این نوع شبکه‌های پروتئینی، فعالیت‌های اساسی داخل‌سلولی و همچنین خارج‌سلولی را برعهده دارند.

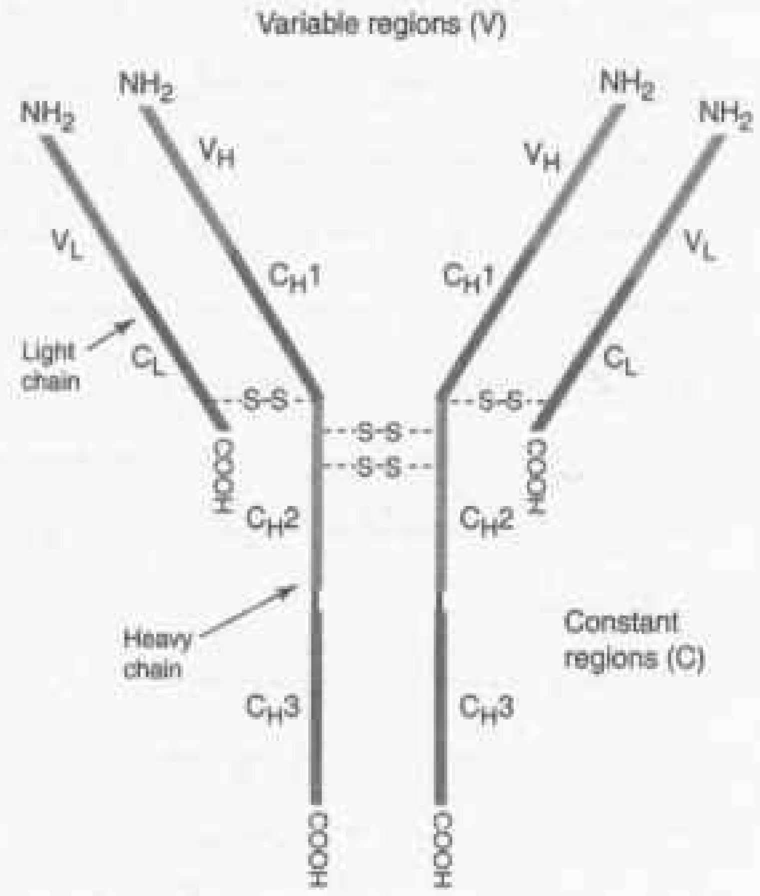
۲-۹ • ملکول‌های آنتی‌بادی: فوق‌خانواده پروتئین‌ها

ملکول‌های آنتی‌بادی توسط لنفوسیت‌ها در پاسخ به ترکیبات خارجی تولید می‌شوند که می‌توانند پروتئین، پلیمرهای کربوهیدراتی پیچیده یا اسید نوکلئیک باشند. آنتی‌بادی‌ها به‌طور غیرکووالان به ترکیبات خارجی موجود در پوشش پروتئینی ویروس‌ها و سلول‌های باکتریایی مهاجم اتصال یافته و فرایندی را آغاز می‌کنند که از طریق آن موجود مهاجم حذف می‌شود. ملکول‌هایی که سبب القاء تولید آنتی‌بادی می‌شوند را **آنتی‌ژن** گویند و ممکن است شاخص‌های آنتی‌ژنیکی یا اپی‌توپ‌های متعددی را داشته باشند که نواحی کوچکی از ملکول آنتی‌ژن هستند که تولید یک آنتی‌بادی اختصاصی را سبب می‌شوند که به آنتی‌ژن اتصال می‌یابد. برای مثال در پروتئین‌ها، یک شاخص آنتی‌ژنیکی ممکن است شامل تنها شش یا هفت ریشه اسید آمینه باشد و یک پروتئین واحد ممکن است تعداد زیادی شاخص آنتی‌ژنیکی داشته باشد.

یک **هاپتن** ملکول کوچکی است که به تنهایی نمی‌تواند تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی را آغاز کند، ولی وقتی به‌طور کووالان به یک ملکول بزرگتر اتصال می‌یابد، به‌عنوان یک شاخص آنتی‌ژنیکی عمل نموده و سنتز آنتی‌بادی را القاء می‌کند. با وجود اینکه لازم است هاپتن‌ها برای تحریک سنتز آنتی‌بادی به یک ملکول بزرگتر اتصال یابند، در حالت آزاد می‌توانند به شکل محکمی به آنتی‌بادی متصل شوند.

انسان پتانسیل تولید حدود 1×10^{8} ساختمان آنتی‌بادی مختلف را دارد. هر چند تمامی

1. Basement membrane



شکل ۱-۹ نمایش خطی ملکول آنتی‌بادی IgG دو زنجیر سنگین (H) و دو زنجیر سبک (L) به‌طور موازی نسبت به یکدیگر قرار می‌گیرند. زنجیرهای H به یکدیگر و زنجیرهای L به زنجیرهای H از طریق پیوندهای دی‌سولفیدی اتصال می‌یابند. تکرارهای فولد ایمونوگلبولینی در نواحی ثابت (C) زنجیر H شامل C_H1، C_H2 و C_H3 می‌باشند. ناحیه ثابت زنجیر L با C_L مشخص می‌شود و نواحی متغیر (V) برای زنجیرهای H و L به ترتیب شامل V_H و V_L می‌باشند.

آنتی‌بادی‌ها یک ساختمان کلی مشابه دارند. این ساختمان براساس مطالعات انجام‌شده بر روی توالی اسید آمینه‌ای و انکسار اشعه-X ملکول آنتی‌بادی، تنها یا در حالت کمپلکس با آنتی‌ژن تعیین شده است. مطالعات ساختمانی نیاز به فراورده‌های پروتئینی هُموژنوس خالص دارد. به دلیل وجود هزاران ملکول آنتی‌بادی مختلف در پلاسما، تخلیص آنتی‌بادی‌ها از پلاسما فوق‌العاده مشکل است. هر چند، آنتی‌بادی‌های هُموژنوس را می‌توان با تکنیک هیبریدومای منوکلونال به دست آورد که در آن سلول‌های میلومای موش با لنفوسیت‌های B تولیدکننده-آنتی‌بادی موشی خانگی ادغام شده تا سلول‌های هیبریدومای نامیرایی تولید شود که یک آنتی‌بادی را بیان می‌کند.

ملکول‌های آنتی‌بادی چهار زنجیر پلی‌پپتیدی دارند

ملکول‌های آنتی‌بادی گلیکوپروتئین‌هایی متشکل از دو زنجیر سبک[1] (L) با توالی یکسان در ترکیب با دو زنجیر سنگین[2] (H) یکسان هستند که ساختمان $(LH)_2$ را به‌وجود می‌آورند. در معمول‌ترین کلاس‌های ایمونوگلبولینی، یعنی IgG، زنجیرهای H حدود ۴۴۰ اسیدآمینه (۵۰kDa) دارند. زنجیرهای L حاوی حدود ۲۲۰ اسید آمینه (۲۵kDa) هستند. این چهار زنجیر به‌طریق کووالان توسط پیوندهای دی‌سولفیدی به یکدیگر اتصال دارند (اشکال ۱-۹ و ۲-۹). هر زنجیر H طوری به یک زنجیر L متصل می‌شود که انتهای آمینوی هر دو زنجیر در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. اندازه زنجیر L نصف اندازه زنجیر H است و تنها نیمه انتهای آمینوی زنجیر H به زنجیر L متصل می‌باشد.

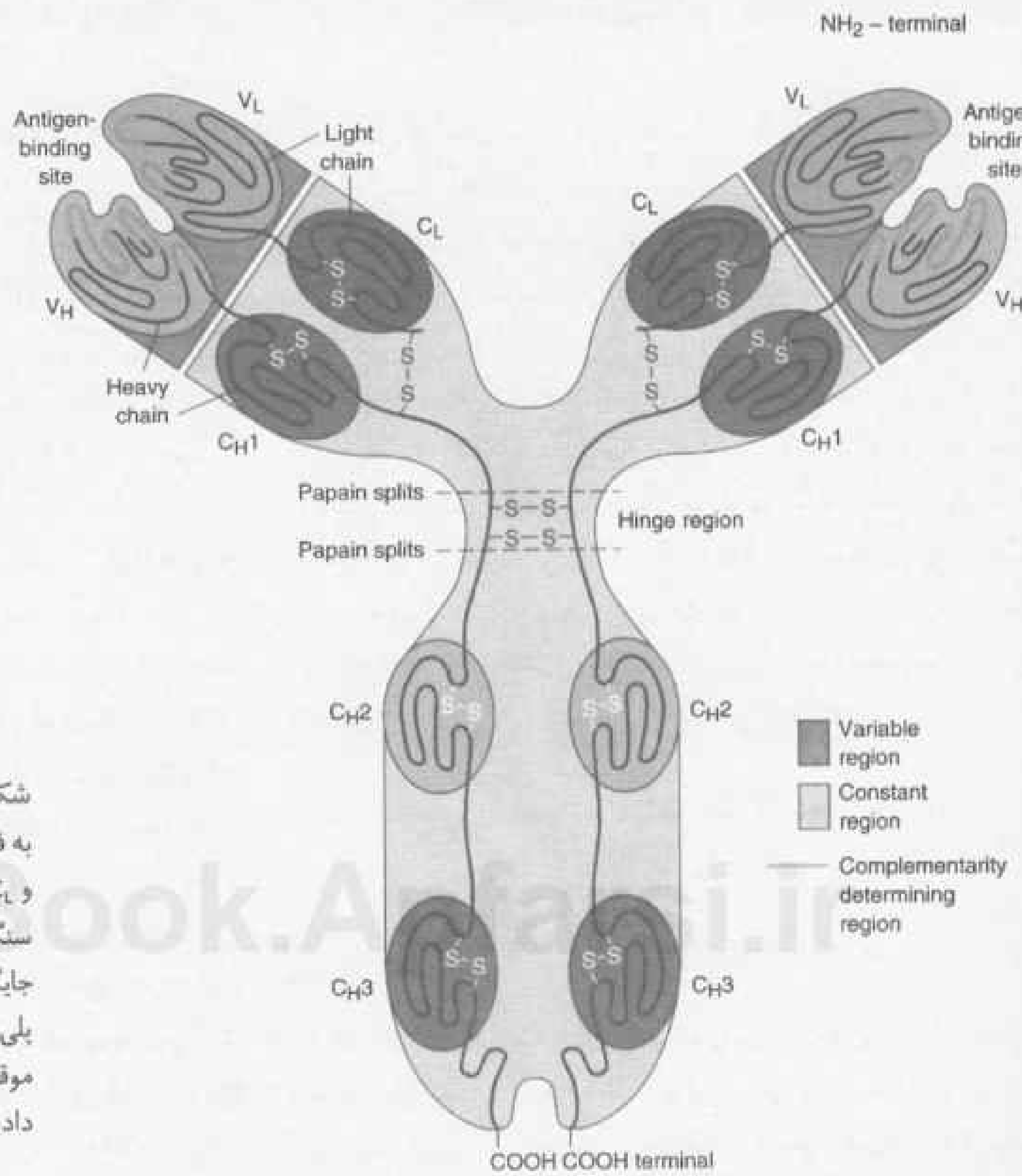
در سایر کلاس‌های ایمونوگلبولینی (جدول ۱-۹)، زنجیرهای H بلندتر از زنجیر H موجود در کلاس IgG هستند. مقدار متغیری (برحسب کلاس، ۲٪ تا ۱۲٪) کربوهیدرات به زنجیر H متصل می‌باشد.

جدول ۱-۹ • کلاس‌های ایمونوگلبولینی

کلاس‌های مربوط به ایمونوگلبولین	جرم ملکولی تقریبی	ایزوتیپ زنجیر H	میزان کربوهیدرات براساس وزن (٪)	غلظت در سرم ($mg 100ml^{-1}$)
IgG	۱۵۰,۰۰۰	γ,۵۳,۰۰۰	۲-۳	۶۰۰-۱۸۰۰
IgA	۱۷۰,۰۰۰-۷۲۰,۰۰۰*	α,۶۴,۰۰۰	۷-۱۲	۹۰-۴۲۰
IgD	۱۶۰,۰۰۰	δ,۵۸,۰۰۰		۰٫۳-۴۰
IgE	۱۹۰,۰۰۰	ε,۷۵,۰۰۰	۱۰-۱۲	۰٫۰۱-۰٫۱۰
IgM	۹۵۰,۰۰۰*	μ,۷۰,۰۰۰	۱۰-۱۲	۵۰-۱۹۰

* از ساختمان‌های پلیمری واحد ساختمانی پایه.

1. Light 2. Heavy



شکل ۲-۹ ساختمان دیاگرامی IgG زنجیرهای سبک (L) به فولدهای ایمونوگلبولینی V_L (توالی اسید آمینه‌ای متغیر) و C_L (توالی اسید آمینه‌ای ثابت) تقسیم می‌شوند. زنجیرهای سنگین (H) به V_H و C_H1، C_H2 و C_H3 تقسیم می‌شوند. جایگاه‌های اتصال به آنتی‌ژن شامل $V_H - V_L$ می‌باشند. پلی‌پپتیدهای «لولا» دومن‌ها را به یکدیگر متصل می‌کنند. موقعیت پیوندهای سیستینی داخل- و بین‌زنجیری نشان داده شده‌اند.

نواحی ثابت و متغیر ساختمان اول

مقایسه توالی‌های اسید آمینه‌ای در ملکول‌های آنتی‌بادی که براساس آنتی‌ژن‌های مختلف مشخص شده است، نواحی از هُمولوژی توالی و نواحی با تنوع توالی را نشان می‌دهد. به‌خصوص، توالی‌های نیمه انتهای آمینوی زنجیرهای L و یک چهارم انتهای آمینوی زنجیرهای H شدیداً متغیر می‌باشند. اینها را **نواحی متغیر**[1] **(V)** می‌نامند که با V_H و V_L به ترتیب زنجیرهای H و L نشان داده می‌شوند. در این نواحی V، برخی زیرنواحی فوق متغیر[2] هستند. معمولاً سه **ناحیه فوق‌متغیر** از ۵ تا ۷ ریشه در V_L و سه یا چهار ناحیه فوق متغیر با ۶ تا ۱۷ ریشه در دومن V_H وجود دارد. با تشکیل جایگاه اتصال به آنتی‌ژن سه- بُعدی مکمل توپولوژی آنتی‌ژن، به اینها **نواحی تعیین- مکملیت**[3] **(CDRs)** گفته می‌شود.

برعکس، سه چهارم انتهای کربوکسیل زنجیرهای H و نیمه انتهای کربوکسیل زنجیرهای L، از نظر توالی هُمولوگوس با سایر زنجیرهای H یا L همان کلاس هستند.

1. Variable regions 2. Hypervariable 3. Complementarity-determining regions

ارتباط بالینی ۱-۹

پروتئین‌های کمپلمان

سیستم کمپلمان شامل حداقل ۳۰ پروتئین مکمل متفاوت در پلاسما است (برای نامگذاری آنها به صفحه ۱۳۰۷ مراجعه کنید). این پروتئین‌ها وارد آبشارهای بیوشیمیایی می‌شوند که در جهت حذف عوامل بیماریزا و مواد خارجی از یک ارگانیسم عمل می‌کنند. سه مسیر مجزا (مسیرهای کلاسیک، لکتین و آلترناتیو وجود دارند، شکل را ببینید) از پیام‌های ابتدایی متفاوتی برای فعال‌سازی سیستم کمپلمان استفاده می‌کنند. این سه مسیر در محل فاکتور C3 به یکدیگر می‌رسند تا تولید C3a و C3b کنند که حوادث فعال‌سازی بعدی را سبب می‌شوند.

بسیاری از پروتئین‌های کمپلمان پیش‌سازهای غیرفعال یا زیموژن‌هایی از آنزیم‌های سرین پروتئاز هستند. با فعال‌سازی، اینها پروتئین بعدی مسیر را از طریق شکستن یک پیوند اختصاصی در این پروتئین سوبسترا فعال می‌کنند که نتیجه آن تولید یک سرین پروتئاز فعال می‌باشد. فعال‌سازی از طریق هیدرولیز یک پیوند پپتیدی یک روش مهم برای فعال‌سازی پروتئازهای خارج‌سلولی است. برای مثال، آنزیم‌های سرین پروتئازی که تشکیل لخته خون را کاتالیز می‌کنند، فیبرینولیز لخته‌های خونی (ص ۱۳۲۲)، و هضم پروتئین‌های غذایی در روده (ص ۱۳۸۶) بیشتر توسط پروتئازهای اختصاصی فرادست فعال می‌شوند. این مسیرهای متوالی فعال‌سازی پروتئازی متوالی، آبشارهایی را به وجود می‌آورند که طی آنها رخداد آغازکننده تقویت می‌گردد.

مسیر کلاسیک با اتصال آنتی‌بادی IgG یا IgM به آنتی‌ژن‌های موجود در سطح خارجی سلول‌های باکتریایی مهاجم، تک‌یاخته‌ها یا سلول‌های سرطانی آغاز می‌گردد. با اتصال به یک آنتی‌ژن سلولی، در نتیجه یک تغییر کونفورماسیونی، جایگاه اتصال به کمپلمان موجود در قسمت Fc آنتی‌بادی در معرض قرار می‌گیرد. این تغییر امکان اتصال پروتئین‌های کمپلمان C1 به آنتی‌بادی متصل به سطح سلول را فراهم می‌سازد. کمپلکس C1 متشکل از پروتئین‌های C1q، C1r و C1s است. پروتئین‌های C1r و C1s موجود در این کمپلکس متحمل یک تغییر کونفورماسیونی شده و به آنزیم‌های سرین پروتئاز فعال موجود در سطح سلول تبدیل می‌شوند. این کمپلکس C1 فعال‌شده (C1a) یک پیوند پپتیدی را در C2 و C4 هیدرولیز می‌کند که در ادامه آنها نیز به غشاء سلول متصل می‌ماند. حال کمپلکس C2a-C4b دارای فعالیت پروتئولیتیک، C3 کانورتاز مسیر کلاسیک است (شکل، کمپلکس ۵) و یک پیوند پپتیدی را در C3 می‌شکنند تا تولید C3a و C3b کنند. C3a یک آنافیلاتوکسین است که سبب فعال‌سازی پلاکت و نوتروفیل، دگرانولاسیون ماست سل، و افزایش نفوذپذیری عروق خونی جهت تسهیل فراخوانی سلول‌های التهابی می‌شود. C3 به سطح سلول هدف اتصال یافته و کمپلکس C2-C4-C3b فعال‌شده به‌طریق پروتئولیتیک، C5 را هیدرولیز کرده تا تولید محصولات C5a و C5b گردد. C5b فعال‌شده به C6، C7 و C8 و چندین ملکول C9 می‌پیوندد که به سطح سلول باکتری اتصال یافته و لیز غشاء سلولی را آغاز می‌کند.

$$\text{IgG or IgM} \xrightarrow{\text{C1q, C1r, C1s}} \overline{\text{C1a}} \xrightarrow{\text{C2, C4}}$$

$$\text{C4b}\cdot\overline{\text{C2a}} \xrightarrow{\text{C3}}$$

$$\text{C4b}\cdot\overline{\text{C2a}}\cdot\text{C3b} \xrightarrow{\text{C5, C6, C7, C8, C9}} \text{lysis}$$

(خط بالای اسامی اشاره به پروتئاز فعال دارد.) به‌علاوه، C5b متصل به غشاء سلول هدف، دارای فعالیت‌های اپسونی و چسبندگی ایمنی است که سبب تسریع در تخریب سلول هدف توسط سلول‌های فاگوسیتیک می‌شود. محصول C5a همراه با C3a در التهاب نقش دارد.

مسیر آلترناتیو می‌تواند در غیاب یک آنتی‌بادی اختصاصی، توسط لیپوساکاریدهای مربوط به میکروارگانیسم‌های مهاجم یا توسط تجمعات IgA فعال شود. مسیر آلترناتیو با همکاری پروپردین و فاکتور D انجام می‌شود. فاکتور D به طریق پروتئولیتیک B را به محصولات Ba و Bb می‌شکند که در سطح سلول هدف به C3 اتصال می‌یابد، و C3 در این

این **نواحی ثابت**[1] (C) با C_H و C_L به ترتیب در زنجیرهای H و L مشخص می‌شوند. نواحی C_H کلاس آنتی‌بادی را تعیین می‌کنند، محلی برای اتصال پروتئین‌های کمپلمان هستند (ارتباط بالینی ۱-۹)، و حاوی جایگاه لازم برای آنتی‌بادی‌ها جهت عبور از غشاء جفت می‌باشند. نواحی V ویژگی آنتی‌ژنی آنتی‌بادی را تعیین می‌کنند.

1. Constant regions

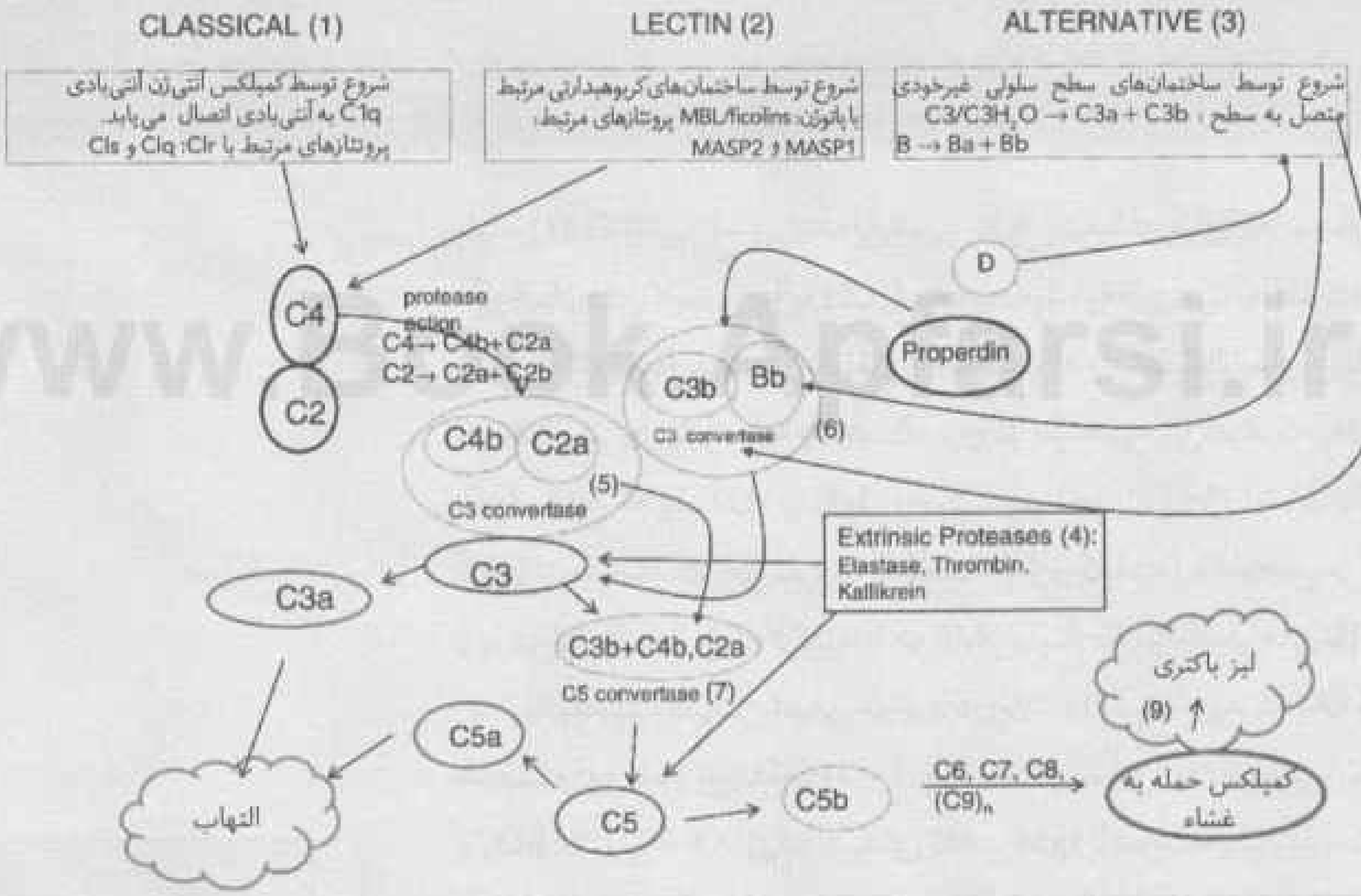
کمپلکس به‌طریق اتوکاتالیتیک یک پیوند پپتیدی را هیدرولیز می‌کند تا تولید C3a و C3b شود. C3b با Bb ترکیب و تولید یک C3 کانورتاز می‌کند که متفاوت از کانورتاز موجود در مسیر کلاسیک است و با اثر بیشتر بر روی ملکول‌های C3 موجود در خون تولید مقادیر زیادی C3a و C3b می‌کند (شکل را ببینید، مسیر ۳).

مسیر لکتین توسط اپسونین، لکتین اتصالی مانوز[1] (MBL) که به پلی- ساکاریدهای مانوزی موجود در میکروارگانیسم مهاجم اتصال می‌یابد، فعال می‌شود. سپس MBL موجود در سطح سلول به سرین پروتئازهای مرتبط با MBL[2]، شامل MASP-1 و MASP-2، اتصال می‌یابد. این کمپلکس مشابه کمپلکس C1 در مسیر کلاسیک است و C4 را در کمپلکس C2-C4 می‌شکنـد تا تولید C4b کنـد که C3 را به C3a و C3b تبدیل می‌کند (شکل، مسیر ۲).

پروتئازهای خارجی آزادشده از گلبول‌های سفید یا فعال‌شده توسط مسیرهای دیگر نیز می‌توانند سیستم کمپلمان را مستقل از کمپلکس‌های کانورتاز فعال کنند (شکل، مسیر ۴).

ناهنجاری‌های سیستم کمپلمان می‌توانند منجر به ناهنجاری‌های التهابی، عفونت‌های پاتوژنی مکرر، بیماری‌های خودایمنی نظیر آرتریت روماتوئید، آسیب گلومرولی و بیماری‌های چشمی مثل التهاب لایه عروقی چشم و دژنراسیون ماکولار شوند. کمپلکان در ایسکمی و بیماری‌های قلبی- عروقی و همچنین در پیوند اعضاء و بافت‌ها نقش دارد.

1. Mannose-binding protein 2. MBL- associated serine proteases



مسیرهای فعال‌سازی کمپلمان. سه مسیر شامل انواع کلاسیک (۱)، لکتینی (۲)، و آلترناتیو (۳) می‌باشند. به‌علاوه، پروتئازهای خارجی (۴) قادر به فعال‌سازی کمپلمان هستند. C3 کانورتاز کلاسیک (۵) توسط هر دو مسیر کلاسیک لکتینی تولید می‌شوند. در حالی‌که یک C3 کانورتاز متفاوت (۶) در مسیر آلترناتیو تولید می‌شود. محصول C3b در کمپلکس C3 کانورتاز همکاری می‌کند (۷). ماحصل مسیرهای کانورتاز شامل التهاب (۸) و لیز باکتری‌های مهاجم (۹) می‌باشند. طرح رنگی: قرمز: فعال‌کننده‌های، قهوه‌ای: آنزیم‌های پروتئولیتیک، نارنجی: و سوبستراهای پروتئینی خنثی، آبی.

ایمونوگلبولین‌های موجود در یک کلاس، نواحی CH هُمولوگوس دارند

تفاوت‌های موجود در نواحی بین C_H کلاس‌های ایمونوگلبولینی، خصوصیات هر کلاس را تعیین می‌کنند. در برخی کلاس‌ها، توالی C_H، پلیمریزاسیون ملکول‌های دارای ساختمان

ارتباط بالینی ۲-۹

فعالیت کلاس‌های آنتی‌بادی مختلف

کلاس IgA ایمونوگلبولین‌ها اساساً در ترشحات مخاطی (ترشحات مربوط به برونش، بینی، و مخاط گوارشی؛ اشک؛ شیر؛ و کلستروم) وجود دارند. اینها دفاع ابتدایی در برابر عوامل بیماریزای ویروسی و باکتریایی، قبل از ورود آنها به داخل پلاسما یا فضای داخلی دیگر، می‌باشند.

کلاس IgM تنها در پلاسما یافت می‌شود. این کلاس اولین آنتی‌بادی است که به‌میزان قابل توجه در تماس با یک آنتی‌ژن جدید تولید می‌شود. این آنتی‌بادی‌ها سبب تسریع در فاگوسیتوز میکروارگانیسم‌ها توسط ماکروفاژ و لکوسیت‌های چندهسته‌ای شده و همچنین فعال‌کننده‌های قوی کمپلمان هستند (ارتباط بالینی ۱-۳ را ببینید). این آنتی‌بادی‌ها در بسیاری از ترشحات خارجی، ولی به میزان کمتر از IgA وجود دارند.

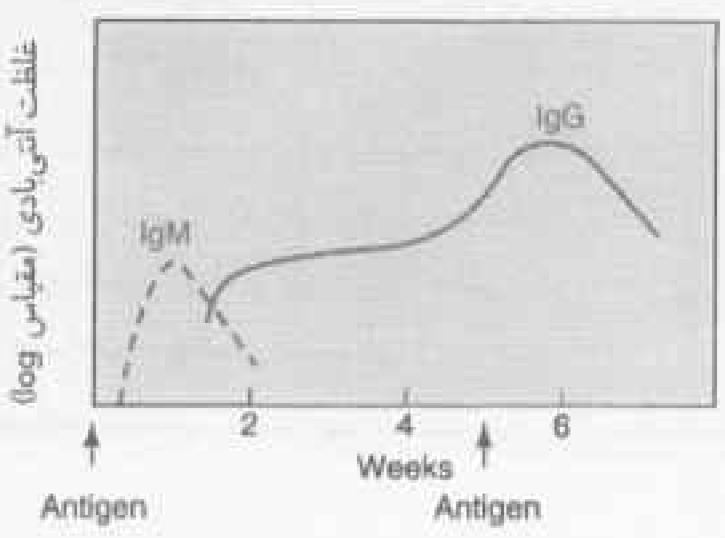
کلاس IgG با غلظت بالا در پلاسما وجود دارد. سنتز این کلاس در پاسخ به آنتی‌ژن‌های خارجی طی یک دوره زمانی طولانی‌تر از IgM رخ می‌دهد. در حداکثر غلظت، IgG به‌میزان به مراتب بیشتری نسبت به IgM وجود دارد. همانند IgM، آنتی‌بادی‌های IgG فاگوسیتوز را در پلاسما تحریک نموده و کمپلمان را فعال می‌سازد.

فعالیت‌های بیولوژیکی طبیعی IgD و IgE ناشناخته می‌باشد؛ هر چند، IgE نقش مهمی در پاسخ‌های آلرژیک نظیر شوک آنافیلاکتیک، تب یونجه و آسم دارد.

کمبود ایمونوگلبولین معمولاً سبب افزایش حساسیت به عفونت می‌شود. مثال‌ها شامل آگاماگلبولینمی متصل به X و کمبود ایمنی متغیر مشترک می‌باشند. معمول‌ترین ناهنجاری، کمبود انتخابی IgA است که منجر به عفونت مکرر سینوس‌ها و مجرای تنفسی می‌شود.

پایه $(LH)_2$ را تسریع می‌کند. به همین دلیل آنتی‌بادی‌های کلاس IgA اغلب به‌صورت ساختمان‌های دیمری $[(CH)_2]_2$ وجود دارند. به‌طور مشابه، ملکول‌های IgM معمولاً پنتامر $[(CH)_2]_5$ هستند. زنجیرهای H متفاوت که براساس توالی‌های اسید آمینه‌ای هُمولوگوس خودشناسایی می‌شوند، با γ، α، δ، ϵ و μ مشخص می‌شوند که به‌ترتیب در کلاس‌های IgG، IgA، IgM، IgD و IgE[1] وجود دارند (جدول ۱-۹؛ ارتباط بالینی ۲-۹). دو نوع توالی زنجیر L سنتز می‌شود که با لامبدا (γ) و کاپا (κ) مشخص می‌شوند و هر کدام از آنها می‌توانند به صورت ترکیب با هر کدام از پنج کلاس زنجیرهای H وجود داشته باشند.

IgG ایمونوگلبولین اصلی موجود در پلاسما است. بیوسنتز یک IgG اختصاصی در غلظت‌های قابل توجه حدود ۱۰ روز بعد از تماس با یک آنتی‌ژن جدید رخ می‌دهد (ارتباط بالینی ۳-۹). آنتی‌بادی‌های کلاس IgM با سرعت بیشتری سنتز می‌شوند و اولین خط دفاعی تا زمان تولید مقادیر زیاد IgG می‌باشند (شکل ۳-۹).



شکل ۳-۹ دوره زمانی پاسخ اختصاصی آنتی‌بادی IgM و IgG به آنتی‌ژن اضافه‌شده.

توالی‌های تکراری و دومن‌های هُمولوگوس سه-بُعدی موجود در یک آنتی‌بادی

در داخل هر زنجیر یک ملکول آنتی‌بادی، یک الگوی تکراری از توالی‌های اسید آمینه‌ای وجود دارد. برای کلاس IgG، این الگوی تکراری شامل حدود ۱۱۰ اسید آمینه در داخل هر دو زنجیر L و H می‌باشد. این هُمولوژی زیاد نیست، ولی در صف‌بندی این قطعات، به شکل آشکاری تعدادی از اسیدهای آمینه تطابق یکسان را دارند. سایر ریشه‌ها با داشتن

۱. این ترتیب می‌بایست به‌صورت IgG، IgA، IgD، IgE و IgM باشد. جدول ۱-۹ را ببینید. مترجم

ارتباط بالینی ۳-۹

ایمونیزاسیون

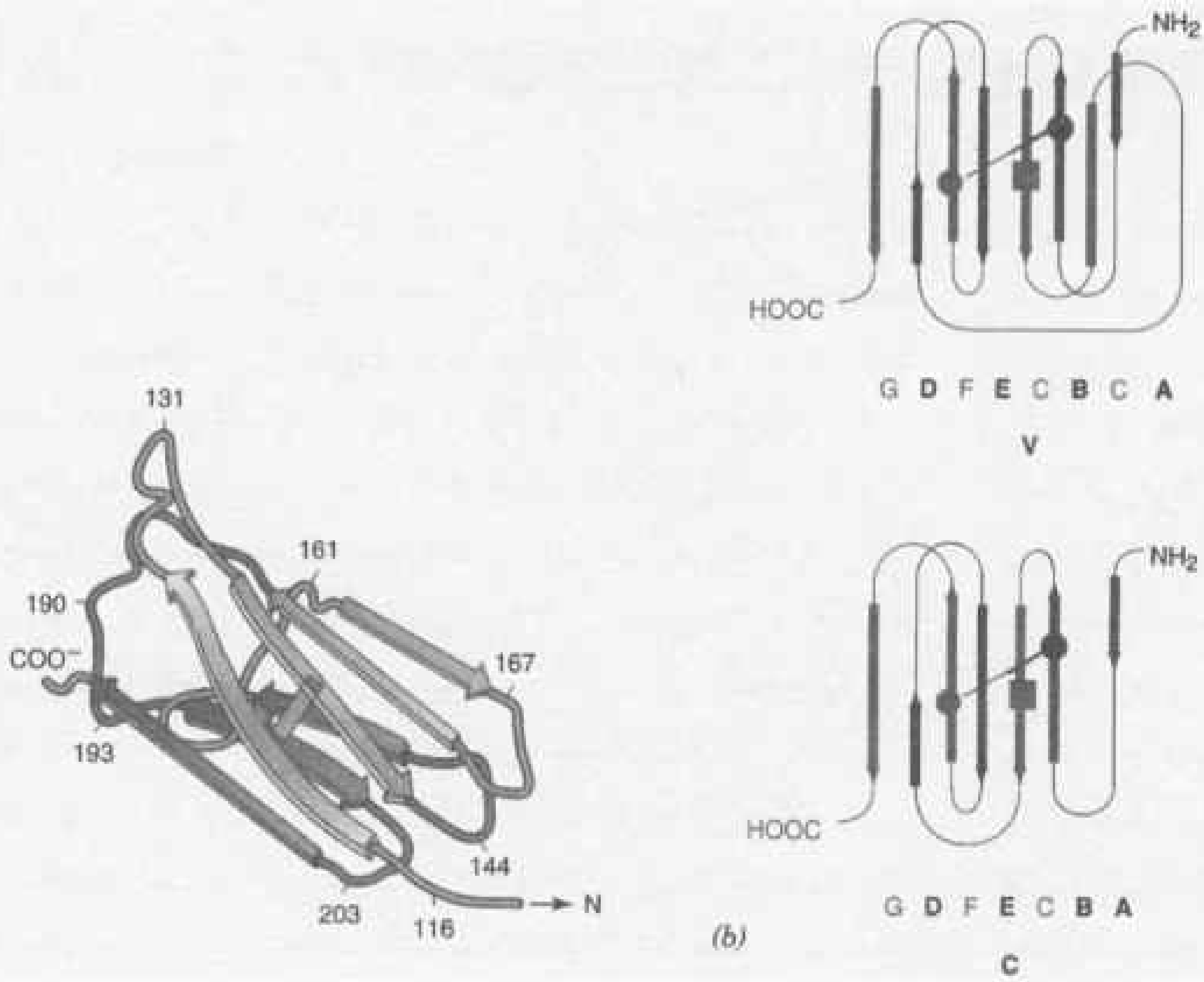
یک واکسن ایمن‌کننده شامل سلول‌های باکتریایی کشته، ویروس‌های غیرفعال‌شده، انگل‌های کشته‌شده، اشکال غیربیماریزای باکتری‌های زنده، سموم باکتریایی دناتوره‌شده یا پروتئین نوترکیبی است. ارائه یک واکسن به انسان منجر به حفاظت در برابر یک شکل بیماریزای میکرو-ارگانیسم‌ها یا عوامل سمّی می‌شود که حاوی همان آنتی‌ژن هستند. آنتی-ژن‌های موجود در ماده غیربیماریزا سبب تمایز سلول‌های لنفوئیدی شده به طوری که در برابر آنتی‌ژن خارجی تولید آنتی‌بادی می‌کنند و همچنین سبب تمایز برخی سلول‌های لنفوئیدی به سلول‌های حافظه می‌گردند. سلول‌های خاطره آنتی‌بادی را ترشح نمی‌کنند، ولی آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن مورد نظر را در سطح خارجی خود قرار داده که در این محل به عنوان حسگرهای آنتی‌ژن برای آینده عمل می‌کنند. این سلول‌های حافظه همانند رادار طولانی-مدت برای آنتی‌ژن دارای پتانسیل بیماریزایی هستند. به دنبال برخورد مجدد بعدی با این آنتی‌ژن، اتصال آنتی‌ژن به این آنتی‌بادی سطح سلولی در سلول‌های حافظه سبب تحریک تقسیم سلول خاطره به سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی و سلول‌های خاطره جدید می‌شود. وقتی ارائه یک آنتی‌ژن رخ داد، این باعث کاهش زمان مورد نیاز برای تولید آنتی‌بادی و افزایش غلظت ابتدایی آنتی‌بادی اختصاصی-آنتی‌ژن می‌شود. این اساس حفاظت حاصل از ایمونیزاسیون می‌باشد.

واکسن‌هایی که در حال حاضر برای بالغین تولید می‌شوند شامل واکسن پنوموکک (برای پیشگیری از پنومونی حاصل از *Diplococcus pneumoniae*)، واکسن هپاتیت B و واکسن آنفلوانزا می‌باشند. ترکیب اخیر در هر سال تغییر می‌کند که به دلیل تنوع آنتی‌ژنیکی در ویروس آنفلوانزا می‌باشد.

زنجیرهای جانبی مشابه غیرقطبی یا قطبی در این توالی تطابق پیدا می‌کنند. این تکرار چهار بار در زنجیرهای H، یکی در ناحیه V_H و سه مورد در نواحی C_H(با C_H1، C_H2 و C_H3 نشان داده می‌شوند)، مشاهده می‌گردد (اشکال ۱-۹ و ۲-۹). زنجیر L تنها یک ناحیه V_L و یک ناحیه C_L دارد. هر تکرار حاوی یک پیوند دی‌سولفیدی بین‌زنجیری است (شکل ۲-۹).

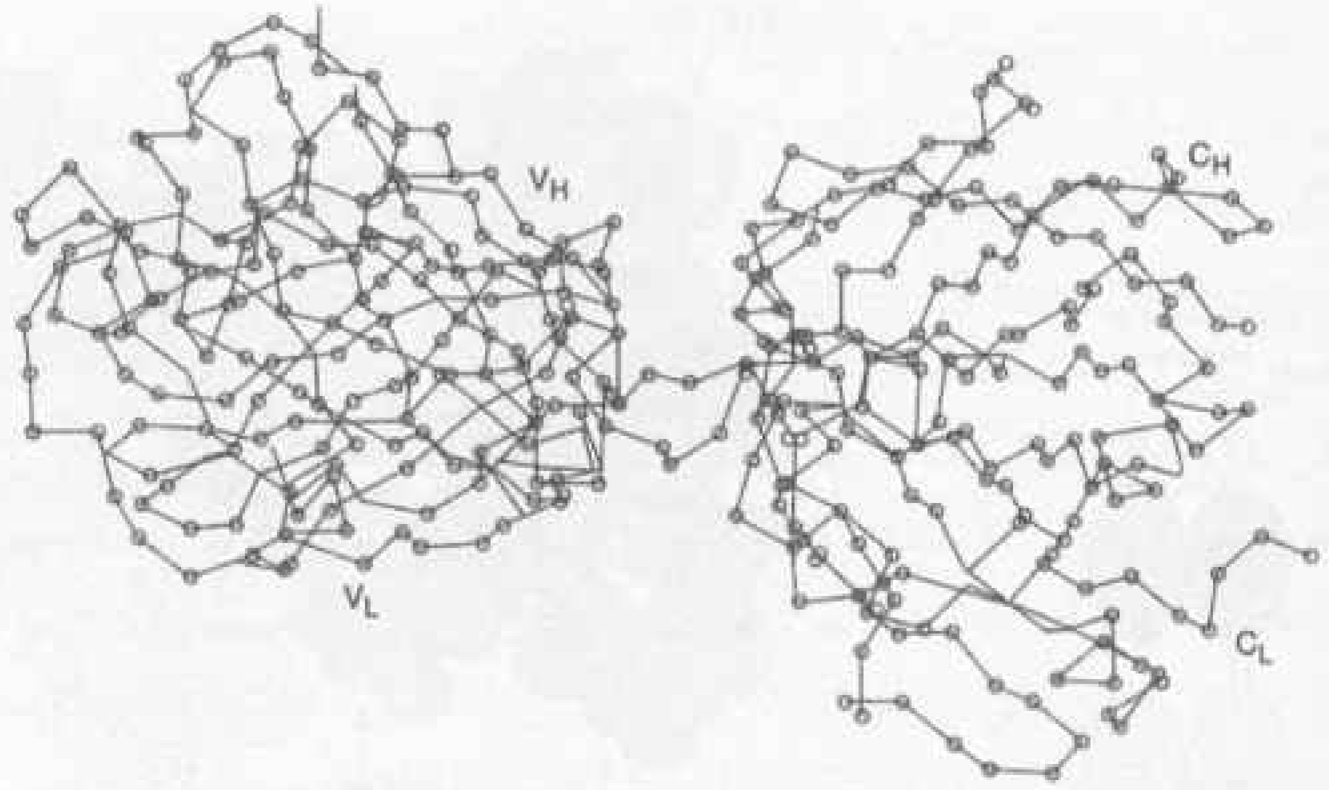
هر قطعه ۱۱۰ اسید آمینه‌ای یک آرایش مشابه رشته‌های β موازی ناهمسو را تحت عنوان **فولد ایمونوگلبولینی**[1] دارد (شکل ۴-۹). این فولد متشکل از ۷ تا ۹ رشته پلی‌پپتیدی در دو صفحه β موازی ناهمسو می‌باشد که رو در رو قرار دارند. پیوستن دو فولد ایمونوگلبولینی از زنجیرهای مختلف، دومن‌های کروی، $V_L - V_H$ و $C_L - C_H1$ بین زنجیرهای H و L، و در نیمه انتهای کربوکسیل زنجیرهای H دومن‌های $C_H2 - C_H2$ و $C_H3 - C_H3$، را به وجود می‌آورد (شکل ۲-۹). دو دومن انتهای آمینوی $V_H - C_H1$ از طریق ناحیه «لولا[2]» به دومن $C_H2 - C_H2$ زنجیرهای H اتصال می‌یابند. لذا ساختمان آنتی‌بادی پایه شش دومن را نشان می‌دهد که هر دومن از تعامل دو فولد ایمونوگلبولینی تولید می‌شود (اشکال ۲-۹ و ۵-۹). دومن‌های انتهای آمینوی $V_L - V_H$ حاوی یک شکاف عمیق در مرکز یک هسته آبگریز هستند که به آنتی‌ژن اتصال می‌یابد. جایگاه اتصالی این شکاف اساساً متشکل از **توالی‌های فوق‌متغیر** دومن V هستند که در داخل قوس‌هایی قرار دارند که در نزدیک یکدیگر قرار گرفته و جایگاه اتصالی مکملیت (نواحی تعیین‌کننده- مکملیت؛ CDRs) برای آنتی ژن هستند (اشکال ۶-۹ و ۷-۹). توالی‌های فوق‌متغیر قوس‌های دومنی، یک کونفورماسیون

1. Immunoglobulin fold 2. Hinge

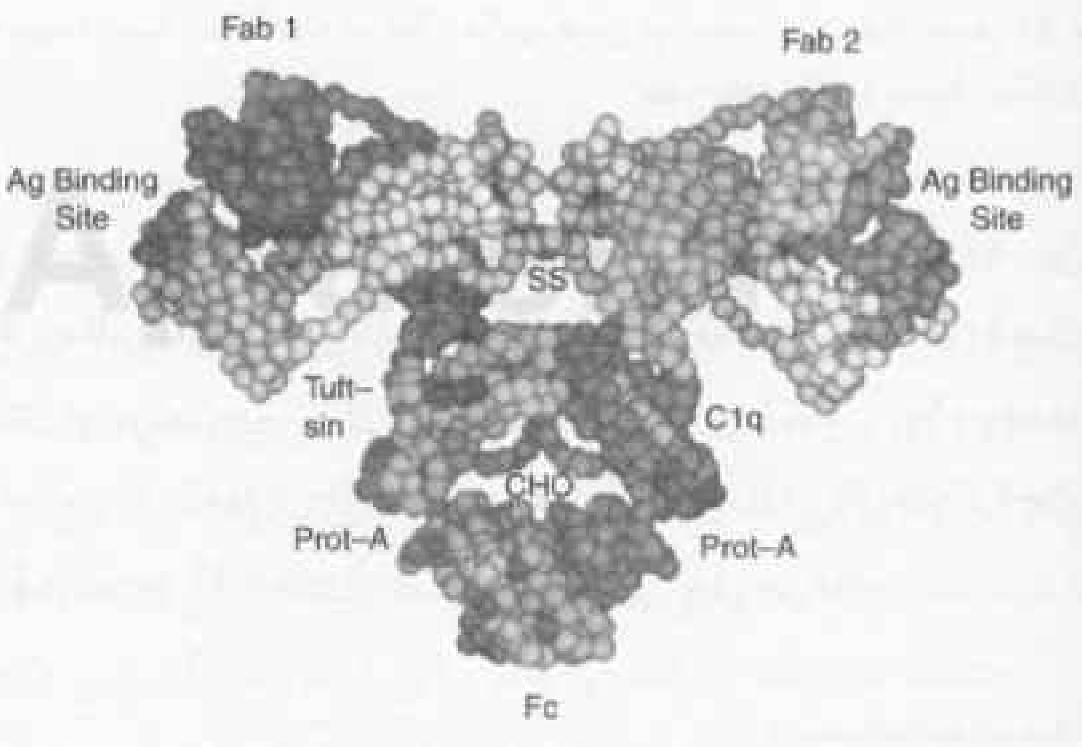


شکل ۴-۹ **فولد ایمونوگلبولینی.** (a) طرح شماتیک تاشدن یک دومن C_L که ساختمان صفحه β را نشان می‌دهد. پیکان‌ها رشته‌های صفحه β را نشان می‌دهند و میله‌ها (آبی) موقعیت پیوند سیستینی را نشان می‌دهند. پیکان‌های صورتی برای رشته‌های β در صفحه بالایی هستند و پیکان‌های قرمز تیره، رشته‌های β موجود در صفحه پایینی می‌باشند. (b) نمایش دیاگرامی آرایش (توپولوژی) رشته‌های β در موتیف فولد ایمونوگلبولینی. مثال‌ها مربوط به نواحی IgG متغیر (دیاگرام بالا) و ثابت (دیاگرام پایین) می‌باشند. پیکان‌های ضخیم رشته‌های β و خطوط نازک قوس‌های متصل‌کننده رشته‌های β را نشان می‌دهند. دایره‌ها سیستئین‌هایی را نشان می‌دهند که تولید پیوند دی‌سولفیدی درون‌دومنی می‌کنند. مربع‌ها موقعیت ریشه‌های تریپتوفان را نشان می‌دهند که یک جزء ثابت هسته فولد ایمونوگلبولینی است. حروف سیاه ضخیم رشته‌هایی را نشان می‌دهند که یک صفحه را به‌وجود می‌آورند، در حالی‌که حروف دیگر صفحه موازی پشت صفحه اول را ایجاد می‌کنند.

سه-بُعدی بی‌همتا را برای هر آنتی‌بادی فراهم می‌کنند که آن آنتی‌بادی را برای ویژگی آنتی‌ژنیکی خود اختصاصی می‌کند. اتصال آنتی‌ژن به دومن‌های $V_L - V_H$ ممکن است تغییرات کونفورماسیونی کوچکی را در CDRs القاء کند که خود القاءکننده تغییرات کونفور-ماسیونی بین دومن‌های $V_L - V_H$ و سایر دومن‌های ملکول آنتی‌بادی است که از نظر عملکرد مهم بوده و منجر به فعال‌سازی جایگاه‌های افکتور، نظیر اتصال کمپلمان به دومن $C_H2 - C_H2$ می‌شود؛ جایگاه C1q را در شکل ۶-۹ ببینید. قدرت اتصال بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن نتیجه نیروهای غیرکووالان می‌باشد (ص ۱۵۸). مکملیت ساختمان‌های مربوط به شاخص آنتی‌ژنیکی و جایگاه اتصال به آنتی‌ژن منجر به ثابت‌های تمایل تعادلی فوق‌العاده بالا، بین 10^5 و 10^{12}/M (قدرت ۶۰-۳۰ kJ/mol یا ۱۴-۷ kcal/mol) برای این پیوستن غیرکووالان می‌شود.



شکل ۵-۹ ساختمان کربن α (O) یک قطعه انتهای آمینوی IgG KOL که دومن‌های $V_L - V_H$ و $C_L - C_H1$ را نشان می‌دهند، هر دومن از دو فولد ایمونوگلبولینی تولید می‌شود.

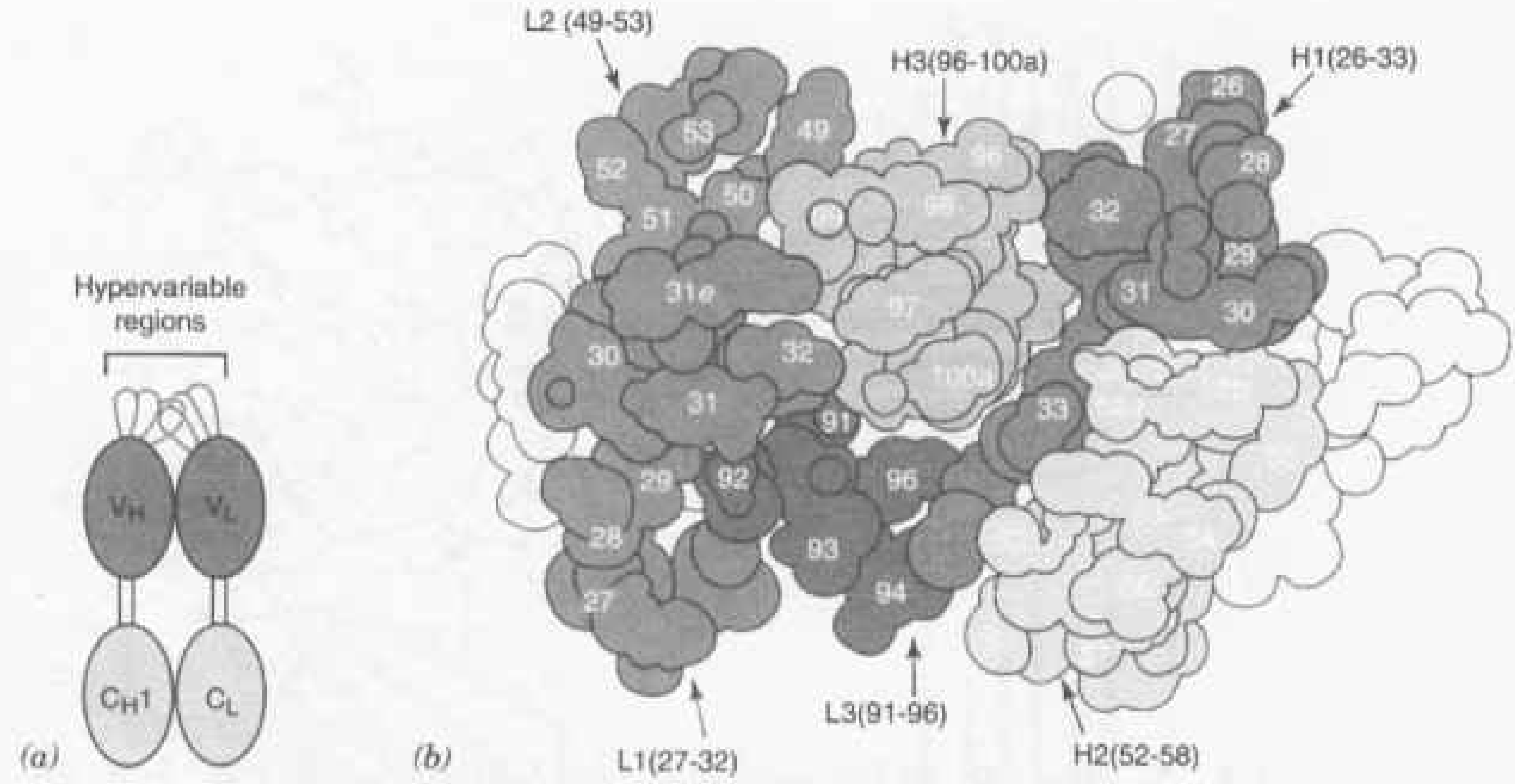


شکل ۶-۹ مدل یک ملکول آنتی‌بادی IgG. تنها کربن‌های α ساختمان نمایان هستند. دو زنجیر L توسط کره‌های خاکستری روشن و زنجیرهای H توسط کره‌های بنفش کمرنگ و آبی مشخص شده‌اند. کربوهیدرات‌های متصل به دو دومن C_H2 رنگ نارنجی و سبز روشن دارند. نواحی CDR دومن‌های $V_H - V_L$ در زنجیرهای H قرمز و در زنجیرهای L صورتی هستند. پیوند دی‌سولفیدی بین‌زنجیری موجود در بین زنجیرهای L و H به صورت گوی و میله مازنتا (تا حدودی پنهان است) نمایش داده شده است. لولای هپتاپپتیدی بین دومن‌های C_H1 و C_H2 قرمز تیره است مرکز جایگاه اتصال به C1q در دومن‌های C_H2 زرد. جایگاه لنگراندازی پروتئین A در محل اتصال C_H2 و C_H3 مازنتا، و جایگاه اتصالی توفتسین (tuftsin) در C_H2 خاکستری است. توفتسین یک تتراپپتید طبیعی است، که فاگوسیتوز توسط ماکروفاژها را القاء می‌کند و ممکن است به شکل متصل به یک ایمونوگلبولین انتقال داده شود. پروتئین A یک پروتئین باکتریایی با تمایل بالا به ایمونوگلبولین‌ها می‌باشد.

دو جایگاه اتصال به آنتی‌ژن در هر ملکول آنتی‌بادی وجود دارد

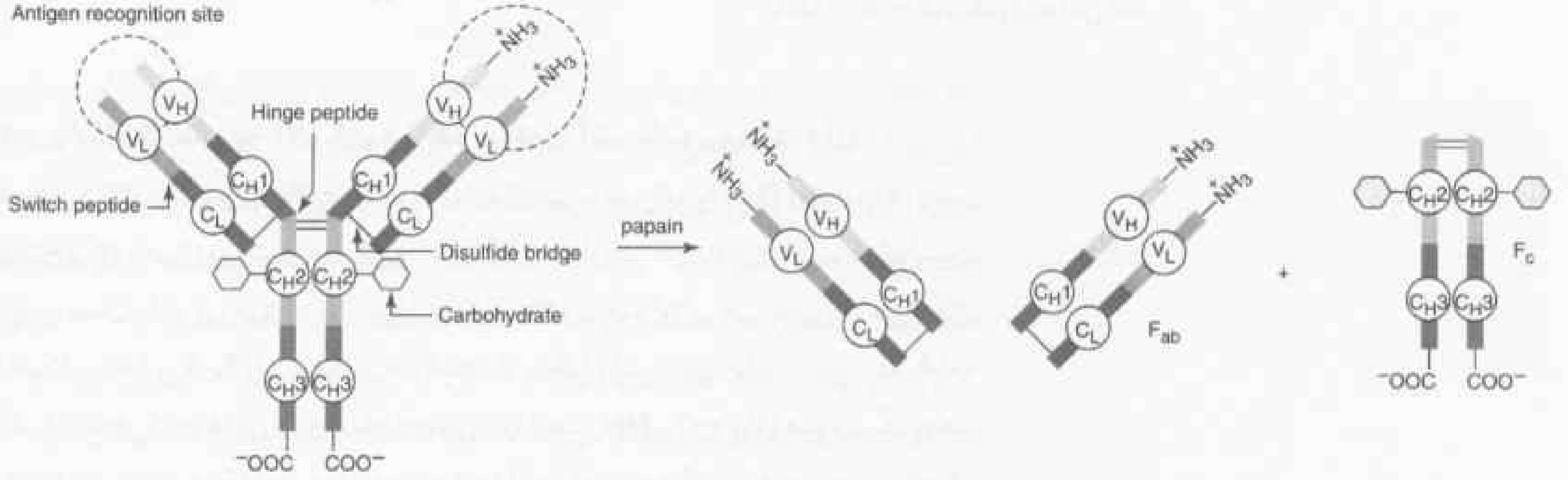
دو دومن انتهای آمینوی $V_L - V_H$ در ساختمان آنتی‌بادی پایه $(LH)_2$ وجود دارد. وجود یک جایگاه اتصال به آنتی‌ژن در هر جفت LH با مجاورت آنتی‌بادی با آنزیم پروتئولیتیک پاپاین نشان داده می‌شود که یک پیوند پپتیدی را در ناحیه لولای هر زنجیر H می‌شکند (اشکال ۲-۹ و ۸-۹ را ببینید) تا سه قطعه از ملکول آنتی‌بادی حاصل شود. دو قطعه یکسان که هر کدام حاوی نیمه انتهای آمینوی یک زنجیر $H(V_H - C_H1)$ همراه با یک زنجیر L کامل می‌باشد. هر کدام از این قطعات با تمایل مشابهی به ملکول سالم آنتی‌بادی اتصال می‌یابد و به صورت F_{ab} **(قطعه اتصال به آنتی‌ژن[1])** نامیده می‌شود. قطعه دیگر دو نیمه

1. Antigen binding fragment



شکل ۷-۹ **قوس‌های فوق‌متغیر در ایمونوگلبولین.** (a) دیاگرام شماتیک که قوس‌های فوق‌متغیر (CDRs) را در دومن $V_L - V_H$ مربوط به جایگاه اتصالی آنتی‌ژن نشان می‌دهند. (b) یک برش در میان جایگاه اتصالی آنتی‌ژن که همکاری CDRهای مختلف را با استفاده از مدل‌های فضا-پرکن CPK اتم‌ها نشان می‌دهد. اعداد اشاره به شماره ریشه اسید آمینه در توالی نواحی قوس فوق‌متغیر زنجیرهای سبک (L) و سنگین (H) دارند.

انتهای کربوکسیل دو زنجیر H $(C_H2-C_H3)_2$ می‌باشد که اتصال سیستینی دارد. این قطعه F_c **(قطعه قابل کریستالیزه نمودن**[1]) می‌باشد که به آنتی‌ژن اتصال نمی‌یابد. با احیاء اتصال پیوندهای دی‌سولفیدی می‌توان زنجیر $V_L - C_L$ را از زنجیر ابتدایی $V_H - C_H1$ در قطعه F_{ab} جدا کرد. براین اساس، هر کدام از جایگاه‌های اتصال به آنتی‌ژن می‌بایست از اجزاء هر دو دومن زنجیر L و زنجیر H به‌وجود آید که با یکدیگر عمل می‌کنند.



شکل ۸-۹ **هیدرولیز IgG به دو قطعه F_{ab} و یک قطعه F_c توسط پاپاین، یک آنزیم پروتئولیتیک.**

1. Crystallizable fragment

خصوصیات اصلی ساختمان آنتی‌بادی و تعاملات آنتی‌ژن-آنتی‌بادی عبارتند از: (۱) توالی‌های هُمولوگوس تکراری در زنجیرهای سبک (L) دو فولد ایمونوگلبولینی و در زنجیرهای سنگین (H) چهار فولد ایمونوگلبولینی به‌وجود می‌آورند. (۲) فولدهای ایمونوگلبولینی موجود بر روی زنجیرهای مجزا به یکدیگر پیوسته تا شش دومن ساختمان ایمونوگلبولینی پایه حاصل شود. (۳) جایگاه اتصال به آنتی‌ژن توسط قوس‌های فوق‌متغیر _(CDRs) در هر دومن $V_L - V_H$ حاصل شده که یک توپولوژی سطحی پیوسته مکملیت با شاخص آنتی‌ژنی را به‌وجود می‌آورند. (۴) تعاملات قوی بین آنتی‌ژن و CDRهای آنتی‌بادی غیرکووالان هستند و شامل تعاملات واندروالس، پیوندهای هیدروژنی، تعاملات آبگریز، و به میزان کمتر پل‌های نمکی یونی می‌باشند. (۵) با اتصال آنتی‌ژن، تغییرات کونفورماسیونی کوچک در دومن $V_L - V_H$ رخ می‌دهد که نشانه یک قالب القاءشده[1] می‌باشد که تغییرات کونفورماسیونی را در دومن‌های دور آنتی‌بادی القاء می‌کند که خود تمایل اتصالی جایگاه‌های افکتوری موجود در دومن‌های ثابت را طوری تغییر می‌دهد که اتصال پروتئین کمپلمان Cl_q به دومن $C_H2 - C_H2$ رخ دهد (ارتباط بالینی ۱-۹ را ببینید).

ژنتیک ایمونوگلبولین‌ها

ناحیه V زنجیرهای L و H توسط ژن‌هایی مشخص می‌گردد که مجزا از ژن‌های کدکننده ناحیه C هستند. چهار ژن بی‌همتا برای کدنودن قطعه پلی‌پپتیدی $C_H1 - C_H2 - C_H3$ زنجیر H در آنتی‌بادی کلاس IgG وجود دارد. اینها را ژن‌های گاما (γ) گویند که شامل γ_1، γ_2، γ_3 و γ_4 هستند که نتیجه آنها تولید **ایزوتیپ‌های IgG**، شامل IgG_1، IgG_2، IgG_3 و IgG_4 می‌باشند. شکل ۹-۹ توالی‌های مربوط به سه پروتئین ژن γ را به نمایش گذاشته است. ۹۵٪ هُمولوژی در توالی اسید آمینه‌ای این ژن‌ها وجود دارد.

احتمال دارد یک ژن ابتدایی یک توالی فولد ایمونوگلبولینی واحد را با حدود ۱۱۰ اسید آمینه کد می‌کرده و حوادث **دوتاشدگی ژن**[2] منجر به تولید سه واحد تکراری در یک ژن IgG H γ شده باشد. جهش‌ها این توالی‌های خاص را طوری تغییر داده‌اند که دیگر ارتباط توالی وجود ندارد. هر چند، هر فولد ایمونوگلبولینی یک طول و الگوی تاشدن مشابه دارد که توسط یک اتصال سیستینی تثبیت می‌شود. بعدها طی دوره تکامل، دوتاشدگی‌های ژنی منجر به تولید ژن‌های متعددی (γ_1، γ_2، γ_3 و γ_4) شد که نواحی ثابت کلاس‌های IgG را کد می‌کردند.

فولد ایمونوگلبولینی در خانواده بزرگی از پروتئین‌هایی با نقش‌های عملکردی متفاوت یافت می‌شود

فولد ایمونوگلبولینی در بسیاری از پروتئین‌های غیرایمونوگلبولینی وجود دارند که فعالیت‌های

1. Induced fit 2. Gene duplication

```
Constant Region C1:
Cγ1: AlaSerThrLysGlyProSerValPheProLeuAlaProSerSerLysSerThrSerGlyGlyThrAlaAlaLeuGly
Cγ2                                          C     R           E  S
Cγ4

Cγ1  CysLeuValLysAspTyrPheProGluProValThrValSerTrpAsnSerGlyAlaLeuThrSerGlyValHisThr
Cγ2
Cγ4

Cγ1  PheProAlaValLeuGlnSerSerGlyLeuTyrSerLeuSerSerValValThrValProSerSerSerLeuGly
Cγ2                                                                         N  F
Cγ4

Cγ1  ThrGlnThrTyrIleCysAsnValAsnHisLysProSerAsnThrLysValAspLysLysVal
Cγ2              T           D                                 T
Cγ4     K                                                      R

Hinge Region H:
Cγ1  GluProLysSerCysAspLysThrHisThrCysProProCysPro
Cγ2      R     C     V  E  C  P  P          -  -  -
Cγ4      S     Y  G  P  P        S          -  -  -

Constant Region C2:
Cγ1  AlaPro    GluLeuLeuGlyGlyProSerValPheLeuPheProProLysProLysAspThrLeuMetIleSerArg
Cγ2            -  P   V  A
Cγ4        E   F      G

Cγ1  ThrProGluValThrCysValValValAspValSerHisGluAspProGluValLysPheAsnTrpTyrValAspGly
Cγ2                                                         Q
Cγ4                                     Q

Cγ1  ValGluValHisAsnAlaLysThrLysProArgGluGluGlnTyrAsnSerThrThrArgValValSerValLeuThr
Cγ2                                             F           F
Cγ4                                                         Y

Cγ1  ValLeuHisGlnAspTrpLeuAsnGlyLysGluTyrLysCysLysValSerAsnLysAlaLeuProAlaProIleGlu
Cγ2     V                                                       G
Cγ4                                                                      S  S

Cγ1  LysThrIleSerLysAlaLys
Cγ2                 T
Cγ4

Constant Region C3:
Cγ1  GlyGlnProArgGluProGlnValTyrThrLeuProProSerArgAspGluLeuThrLysAsnGlnValSerLeuThr
Cγ2                                                E     M
Cγ4                                             Q

Cγ1  CysLeuValLysGlyPheTyrProSerAspIleAlaValGluTrpGluSerAsnGlyGlnProGluAsnAsnTyrLys
Cγ2
Cγ4

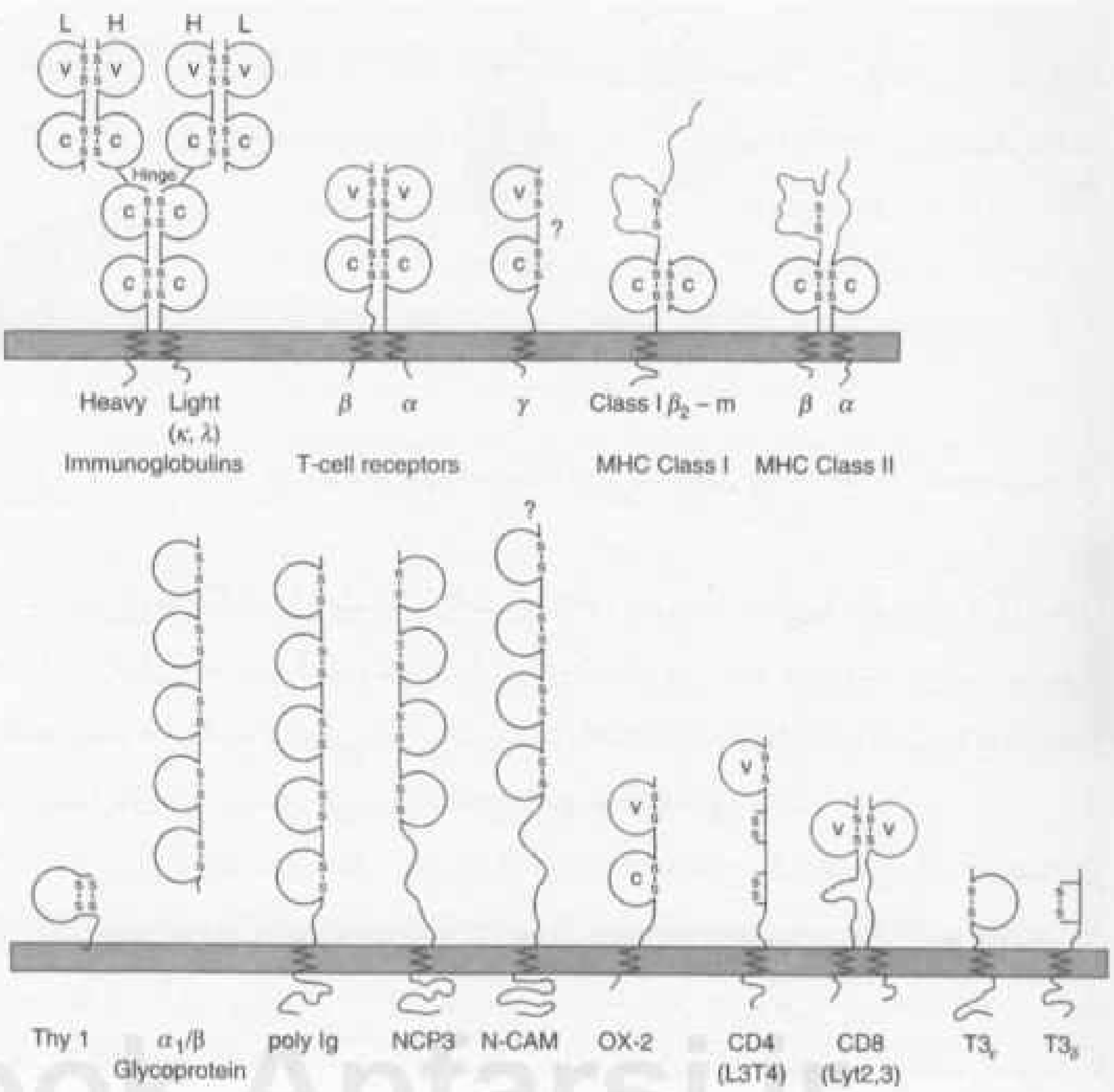
Cγ1  ThrThrProProValLeuAspSerAspGlySerPhePheLeuTyrSerLysLeuThrValAspLysSerArgTrpGln
Cγ2              M
Cγ4                                                   R

Cγ1  GlnGlyAsnValPheSerCysSerValMetHisGluAlaLeuHisAsnHisTyrThrGlnLysSerLeuSerLeuSer
Cγ2
Cγ4  E

Cγ1  ProGlyLysStop
Cγ2
Cγ4  L
```

شکل ۹-۹ توالی اسید آمینه‌ای نواحی ثابت زنجیر سنگین ژن‌های زنجیر سنگین $\gamma1$، $\gamma2$، و $\gamma4$ مربوط به IgG. توالی‌های C_H1، ناحیه لولای H، C_H2، و C_H3 نمایش داده شده‌اند. توالی $\gamma1$ کامل است و تفاوت‌های موجود در $\gamma2$ و $\gamma4$ نسبت به توالی $\gamma1$ با استفاده از مخفف‌های تک-حرفی اسیدهای آمینه نشان داده شده است. وجود خط کوچک (–) اشاره به عدم وجود یک اسید آمینه در موقعیت مرتبط با $\gamma1$ دارد، تا صف‌بندی توالی‌ها برای نمایش هُمولوژی بهتر شود.

بسیار متفاوتی دارند. براساس هُمولوژی ساختمانی، اینها در یک **فوق خانواده پروتئینی** قرار می‌گیرند (شکل ۱۰-۹). پروتئین‌های کمپلکس سازگاری نسجی اصلی I در این فوق-خانواده قرار دارند؛ اینها دارای فولدهای ایمونوگلبولینی هستند که همانند انواع موجود در ملکول‌های آنتی‌بادی، متشکل از دو صفحه β موازی ناهمسو متراکم در کنار یکدیگر می‌باشند که یک فضای داخلی پر از اساساً اسیدهای آمینه آبگریز را احاطه کرده‌اند. دو سیستئین ساختمانی بین دو صفحه مقابل ایجاد پیوند دی‌سولفیدی می‌کنند. فاکتورهای رونویسی $Nf-\kappa B$ و p53 نیز موتیف فولد ایمونوگلبولینی را دارند. تصور می‌رود که



شکل ۱۰-۹ نمایش دیاگرامی ساختمان فولد ایمونو-گلبولینی موجود در پروتئین‌های مختلف فوق‌خانواده ژن ایمونوگلبولینی. پروتئین‌های موجود شامل زنجیرهای سنگین و سبک ایمونوگلبولین‌ها هستند. گیرنده‌های سلول T، پروتئین‌های کمپلکس سازگاری نسجی (MHC) کلاس I و کلاس II، پروتئین‌های فرعی سلول T درگیر در شناسایی MHC کلاس I (CD8) و کلاس II (CD4) و تولید کانال یونی احتمالی، یک گیرنده مسئول انتقال برخی کلاس‌های ایمونوگلبولینی در عرض غشاءهای مخاطی (poly – Ig)، β_2– میکروگلبولین که به ملکول‌های کلاس I می‌پیوندند، یک پروتئین پلاسمایی انسانی با عملکرد ناشناخته (α_1/β–گلیکوپروتئین)، دو ملکول با عملکرد ناشناخته با یک توزیع بافتی که شامل لنفوسیت‌ها و نورون‌ها می‌باشد (Thy-1، OX-2) و دو ملکول اختصاصی-مغز، ملکول چسبندگی سلول نورونی (N – CAM) و پروتئین نوروسیتوپلاسمی ۳(NCP3).

دوتاشدگی ژنی در طی دوره تکامل منجر به توزیع موتیف فولد ایمونوگلبولینی در پروتئین‌هایی با عملکرد متنوع شده است.

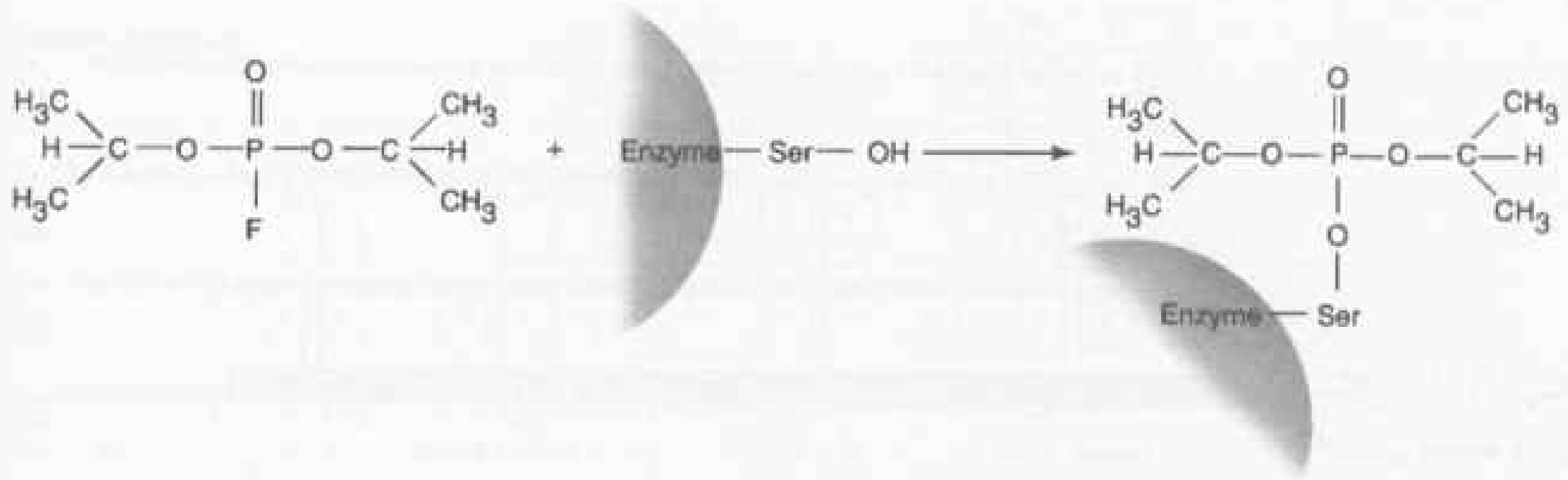
۳-۹ • پروتئین‌های دارای یک مکانیسم کاتالیتیک مشترک: سرین پروتئازها

سرین پروتئازها خانواده‌ای از آنزیم‌ها هستند که از یک ریشه سرین فعال‌شده بی‌همتا در جایگاه اتصال خود برای هیدرولیز کاتالیتیکی پیوندهای پپتیدی استفاده می‌کنند. این سرین با واکنش غیرقابل برگشت زنجیر جانبی خود با دی‌ایزوپروپیل فلوروفسفات[1] (DFP) شناسایی می‌شود (شکل ۱۱-۹). از میان تمامی سرین‌های موجود در پروتئین، DFP تنها با این سرین دارای فعالیت کاتالیتیکی واکنش نموده و تولید یک استر فسفات می‌کند.

آنزیم‌های پروتئولیتیک براساس مکانیسم کاتالیتیکی خود طبقه‌بندی می‌شوند

آنزیم‌های پروتئولیتیک براساس مکانیسم کاتالیتیکی خود طبقه‌بندی می‌شوند به غیر از پروتئازهای سرینی، کلاس‌های دیگر پروتئازها برای انجام فعالیت کاتالیتیکی خود از سیستئین

1. Diisopropylfluorophosphate



شکل ۱۱-۹ واکنش دی‌ایزوپروپیل‌فلوروفسفات (DFP) با یک سرین جایگاه-فعال در یک سرین پروتئاز.

(سیستئین پروتئازها)، آسپارتات **(آسپارتات پروتئازها)** یا یون‌های فلزی **(متالوپروتئازها)** استفاده می‌کنند. آنهایی که پیوندهای پپتیدی را در درون یک پلی‌پپتید هیدرولیز می‌کنند به‌عنوان **آندوپپتیداز** می‌باشند و آنهایی که پیوند پپتیدی اسید آمینه انتهای کربوکسیل یا آمینو را در سوبستراهای پلی‌پپتیدی می‌شکنند، جزء **اگزوپپتیدازها** می‌باشند.

سرین پروتئازها اغلب سایر سرین پروتئازها را با شکستن یک پیوند پپتیدی اختصاصی در پیش‌ساز غیرفعال آنها، تحت عنوان **زیموژن**[1]، فعال می‌کنند. این مکانیسم فعال‌سازی زیموژن به سرین پروتئازها اجازه شرکت در فرایندهای فیزیولوژیکی تحت کنترل دقیق نظیر انعقادخون (ارتباط بالینی ۴-۹)، فیبرینولیز، فعال‌سازی کمپلمان (ارتباط بالینی ۱-۹ را ببینید)، باروری، و تولید هورمون را می‌دهند (جدول ۲-۹). فعال‌سازی سرین پروتئازها، مثال‌هایی از **پروتئولیز محدودشده**[2] هستند، زیرا یک یا دو پیوند پپتیدی اختصاصی از صدها سوبسترای پروتئینی را هیدرولیز می‌کنند. هرچند، در شرایط دناتوره‌کننده، همین پروتئازها پیوندهای پپتیدی متعددی را هیدرولیز می‌کنند که منجر به هضم پپتیدها، پروتئین‌ها و حتی خود- هضمی (اتولیز) می‌گردند. معتقدند چندین بیماری، نظیر آمفیزیم، آرتریت، ترومبوز، متاستاز سرطان (ارتباط بالینی ۵-۹) و برخی اشکال هموفیلی‌ها، نتیجه کمبود تنظیم یک سرین پروتئاز اختصاصی هستند.

سرین پروتئازها ویژگی قابل‌توجهی را از نظر هیدرولیز پیوند پپتیدی نشان می‌دهند

بسیاری از سرین پروتئازها هیدرولیز پیوندهای پپتیدی موجود در مجاورت یک نوع خاص اسیدهای آمینه را ترجیح می‌دهند. برهمین اساس تریپسین ترجیحاً سمت کربوکسیل اسیدهای آمینه بازی آرژنین و لیزین، و کیموتریپسین سمت کربوکسیل ریشه‌های اسید آمینه با زنجیر جانبی آبگریز بزرگ نظیر تریپتوفان، فنیل‌آلانین، تیروزین و لوسین را می‌شکنند. الاستاز سمت کربوکسیل ریشه‌های آبگریز کوچک نظیر آلانین را تجزیه می‌کند. در صورتی‌که ویژگی یک سرین پروتئاز مشابه آنزیم‌های نامبرده باشد، آنها را

1. Zymogen 2. Limited proteolysis

ارتباط بالینی ۴-۹

تولید فیبرین در یک آنفارکت میوکارد و استفاده از فعال‌کننده پلاسمینوژن بافتی نوترکیب (rt-PA)

انعقاد خون حاصل یک فرایند آبشار آنزیمی است که در آن پیش‌ساز سرین پروتئازهای غیرفعال (زیموژن‌ها) توسط سرین پروتئازهای دیگر به شکل مرحله به مرحله فعال می‌شود (مسیر انعقاد در فصل ۲۲ شرح داده شده است). این حوادث فعال‌سازی منجر به تولید محصولات کاتالیتیکی می‌شوند که همراه با تقویت قابل‌توجه پیام ابتدایی مسیر می‌باشد. محصول انتهایی مسیر انعقاد یک لخته فیبرینی دارای اتصالات عرضی است. این اجزاء زیموژنی شامل فاکتور II (پروترومبین)، فاکتور VII (پروکانورتین)، فاکتور IX (فاکتور کریسمیس)، فاکتور X (فاکتور استوارت)، فاکتور XI (پیشرو ترومبوپلاستین پلاسمایی)، و فاکتور XII (فاکتور هاگمن) می‌باشند. اعداد یونانی مورد استفاده، ترتیب کشف آنها را نشان می‌دهد و مربوط به ترتیب عمل آنها در این مسیر نیست. به دنبال فعال‌سازی، نام این آنزیم‌ها یک پسوند «a» می‌گیرند. برهمین اساس، پروترومبین به صورت فاکتور II و ترومبین دارای فعالیت کاتالیتیک به صورت IIa نشان داده می‌شود.

فعالیت اصلی انعقاد در حفظ یکپارچگی سیستم گردش خون بسته بعد از آسیب عروق خونی است. هرچند این فرایند می‌تواند طی آنفارکتوس میوکارد به شکل خطرناکی فعال شده و سبب کاهش جریان خون عضله قلب شود. سالانه حدود ۱/۲ میلیون نفر در ایالات متحده از حملات قلبی رنج می‌برند که منجر به مرگ حدود ۵۰۰,۰۰۰ می‌شود.

بعد از تشکیل لخته، یک مسیر فیبرینولیز در پلاسما آن را تجزیه می‌کند. این مسیر مخالف نیز از سرین پروتئازهایی استفاده می‌کند که از فعال‌سازی زیموژن‌ها تولید می‌شوند. در انتهای واکنش‌های مسیر فیبرینولیز تولید پلاسمین می‌شود که به عنوان یک سرین پروتئاز با اثر مستقیم بر فیبرین سبب تجزیه لخته فیبرینی می‌شود. فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن (uPA) یک فعال‌کننده پلاسمینوژن (زیموژن پلاسمین) است. t-PA نوترکیب (rt-PA) به‌طریق فناوری کلون‌سازی ژن تولید می‌شود (ص ۳۵۵). مطالعات بالینی نشان می‌دهند که تجویز rt-PA به فاصله کوتاهی بعد از آنفارکتوس قلبی، به میزان قابل‌توجهی بهبودی را افزایش می‌دهد. فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن نظیر اوروکیناز و استرپتوکیناز نیز مؤثر هستند.

ارتباط بالینی ۵-۹

نقش سرین پروتئازها در متاستاز سلولی تومور

معتقدند پلاسمینوژن فعال‌کننده سرین پروتئاز اوروکیناز، برای متاستاز سلول‌های سرطانی مورد نیاز است. متاستاز فرایندی است که به‌واسطه آن یک سلول سرطانی تومور اولیه را ترک نموده و از طریق سیستم‌های خونی و لنفی به سایر بافت‌ها یا اعضاء مهاجرت می‌کند و در آنجا تومورهای ثانویه را به وجود می‌آورد. افزایش سنتز فعال‌کننده پلاسمینوژن اوروکیناز-مانند (uPA) با افزایش توانایی متاستاز در بسیاری از بافت‌ها نقش دارد. uPA پلاسمینوژن را فعال نموده تا تولید پلاسمین شود. پلاسمینوژن به شکل فراگیر در فضای خارج‌سلولی قرار دارد و فعال‌سازی آن به پلاسمین می‌تواند منجر به تجزیه پروتئین‌های موجود در ماتریکس خارج‌سلولی شود که از طریق آن سلول‌های متاستازکننده مهاجرت می‌کنند. پلاسمین همچنین می‌تواند پروکلاژن را به کلاژن تبدیل کند که تجزیه کلاژن غشاء پایه احاطه‌کننده مویرگ‌ها و سیستم لنفاوی را تسریع می‌کند. این تسریع فعالیت پروتئولیتیک توسط uPA تولیدی توسط سلول‌های توموری و سلول‌های استرومایی در محیط سلول‌های توموری به این سلول‌ها اجازه تخریب پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی و تهاجم از طریق ماتریکس به محل‌های ثانویه تومور را می‌دهد.

تریپسین-مانند، کیموتریپسین-مانند یا الاستاز-مانند گویند. ویژگی برای یک نوع خاص از اسیدهای آمینه تنها یک ارجحیت نسبی آنزیمی را نشان می‌دهد. تریپسین همچنین پیوندهای پپتیدی را می‌شکند که به‌دنبال اسیدهای آمینه آبگریز قرار دارند، البته این هیدرولیز با سرعتی به مراتب کمتر از اسیدهای آمینه بازی انجام می‌شود. لذا ویژگی هیدرولیز

جدول ۲-۹ • برخی سرین پروتئازها و نقش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آنها

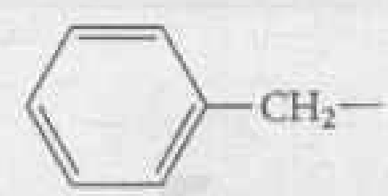
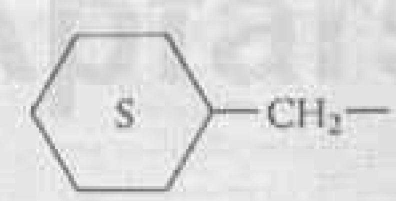
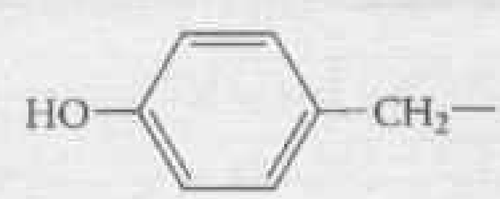
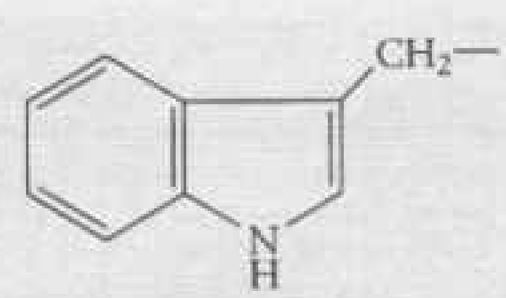
پروتئاز	فعالیت	بیماری احتمالی به‌دلیل کمبود یا اختلال در عملکرد
کالیکرئین پلاسمایی	انعقاد (ارتباط بالینی ۴-۹ را ببینید)	سکته مغزی، سکته قلبی، ترومبوز، ناهنجاری‌های خونریزی
فاکتور XIIa		
فاکتور XIa		
فاکتور IXa		
فاکتور VIIa		
فاکتور Xa		
فاکتور IIa (ترومبین)		
پروتئین C فعال‌شده		
فاکتور Clr	کمپلمان (ارتباط بالینی ۱-۹ را ببینید)	عفونت با عوامل بیماریزا، التهاب، آرتریت روماتوئید، بیماری خودایمنی
فاکتور Cls		
فاکتور D		
فاکتور B		
C3 کانورتاز		
تریپسین	هضم	پانکراتیت، ناهنجاری‌های گوارشی
کیموتریپسین		
الاستاز (پانکراتیک)		
آنتروپپتیداز		
فعال‌کننده پلاسمینوژن اوروکیناز	فیبرینولیز، مهاجرت سلول، آمبریوژنز قاعدگی	ناهنجاری‌های انعقادی، متاستاز تومور (ارتباط بالینی ۵-۹ را ببینید)
فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن		
پلاسمین		
کالیکرئین‌های بافتی	فعال‌سازی هورمون	
آکروزین	باروری	ناباروری
زیرواحد α فاکتور رشد عصبی	فعال‌سازی رشد	
زیرواحد γ فاکتور رشد عصبی		
الاستاز گرانولوسیتی	پروتئین خارج‌سلولی و تخریب پپتیدی، فعالیت ماست سل	التهاب، پاسخ آلرژیک
کاتپسین G		
کیمازهای ماست سل		
تریپتازهای ماست سل		

یک پیوند پپتیدی ممکن است مطلق نباشد، ولی ممکن است به شکل صحیح‌تری به صورت دامنه اهداف احتمالی مهمتر بیان گردد. هر کدام از جایگاه‌های هیدرولیز اسید آمینه‌ای یکسان یک سوبسترای پروتئینی، حساسیت برابری ندارند. تریپسین هر کدام از

پیوندهای پپتیدی آرژنینی را در یک پروتئین خاص با سرعت کاتالیتیکی متفاوتی هیدرولیز می‌کند و برخی ممکن است نیاز به یک تغییر کونفورماسیونی داشته باشند تا آنها را قابل دسترسی کنند.

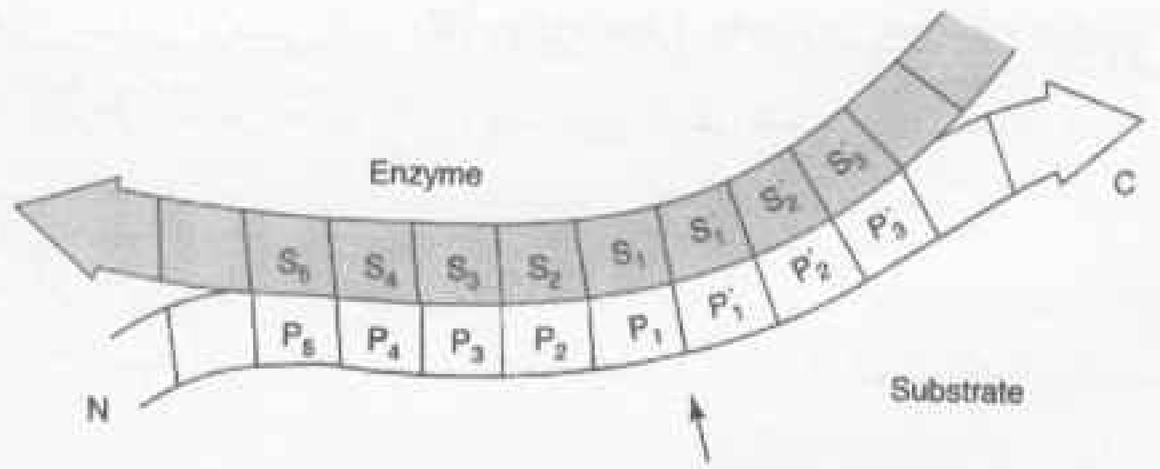
ویژگی سرین پروتئازها برای پیوندهای پپتیدی خاص با سوبستراهای سنتتیک دارای کمتر از ۱۰ اسید آمینه تعیین شده است (جدول ۳-۹). از آنجایی‌که اینها به میزان قابل

جدول ۳-۹ • خاصیت واکنشگری α–کیموتریپسین و الاستاز در برای سوبستراهایی با ساختمان‌های مختلف

ساختمان	تنوع گروه زنجیر جانبی در جایگاه S_1 (کیموتریپسین)	خاصیت واکنشگری نسبی
Glycyl	H—	۱
Leucyl	$(H_3C)_2CH—CH_2—$	$۱٫۶ \times ۱۰^{۴}$
Methionyl	$CH_3—S—CH_2—CH_2—$	$۲٫۴ \times ۱۰^{۴}$
Phenylalanyl		$۴٫۳ \times ۱۰^{۴}$
Hexahydrophenylalanyl		$۸٫۲ \times ۱۰^{۶}$
Tyrosyl		$۳٫۷ \times ۱۰^{۷}$
Tryptophanyl		$۴٫۳ \times ۱۰^{۷}$
تنوع در طول زنجیر (هیدرولیز آمید انتهای آمینوی آلانین توسط الاستاز)[۲]		
$Ac\text{-}Ala\text{-}NH_2$		۱
$Ac\text{-}Pro\text{-}Ala\text{-}NH_2$		$۱٫۴ \times ۱۰^{۱}$
$Ac\text{-}Ala\text{-}Pro\text{-}Ala\text{-}NH_2$		$۴٫۲ \times ۱۰^{۳}$
$Ac\text{-}Pro\text{-}Ala\text{-}Pro\text{-}Ala\text{-}NH_2$		$۴٫۴ \times ۱۰^{۵}$
$Ac\text{-}Ala\text{-}Pro\text{-}Ala\text{-}Pro\text{-}Ala\text{-}NH_2$		$۲٫۷ \times ۱۰^{۵}$

[۱] محاسبه‌شده از مقادیر k_{cat}/K_m یافت‌شده برای استرهای متیل اسید آمینه N–استیل در سوبستراهای کیموتریپسین.

[۲] محاسبه‌شده از مقادیر k_{cat}/K_m در بیوشیمی تامپسون و بلوت ۱۹۷۳، ۵۷:۱۲.



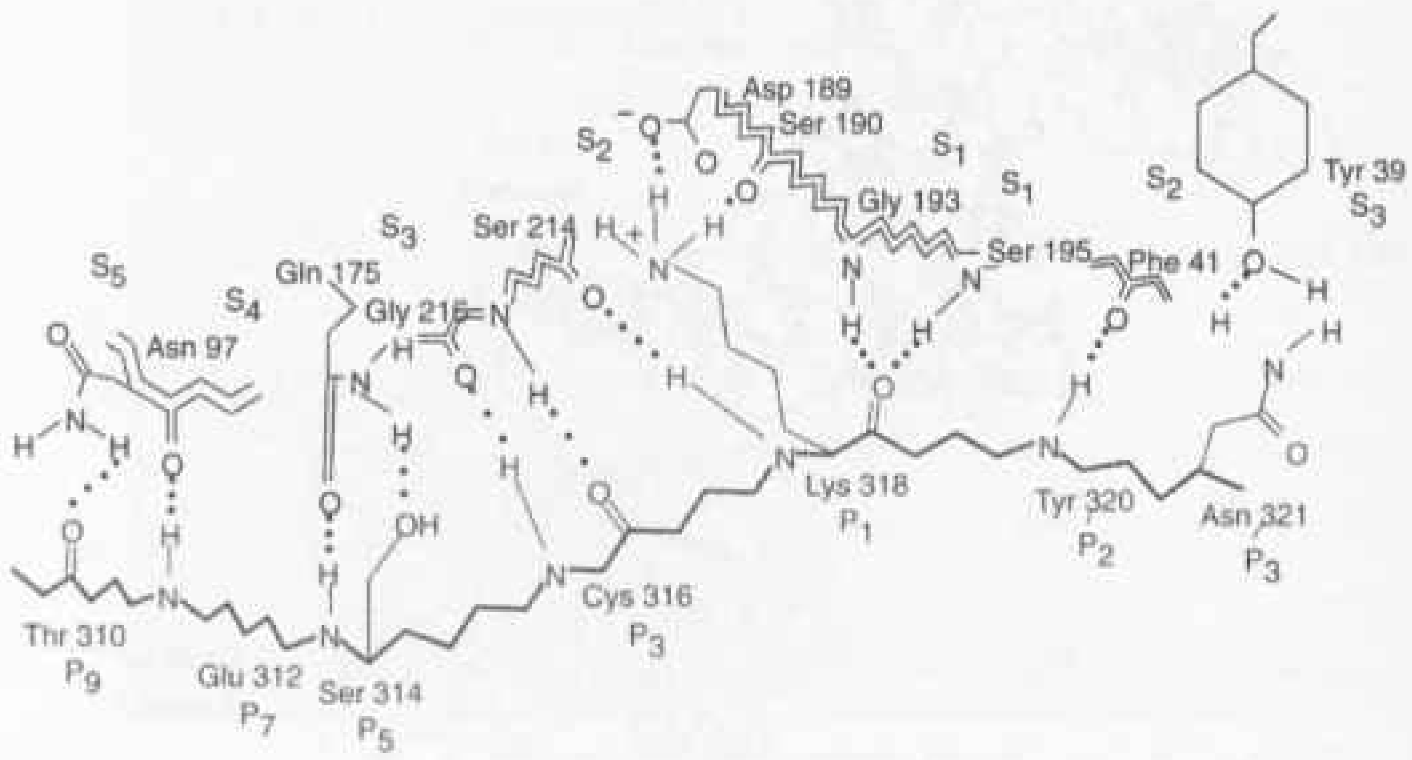
شکل ۱۲-۹ دیاگرام شماتیک اتصال یک سوبسترای پلی‌پپتیدی به جایگاه اتصالی موجود در یک آنزیم پروتئولیتیک. $P_5 - P'_5$ ریشه‌های اسید آمینه موجود در سوبستراها هستند که به زیرجایگاه‌های $S_5 - S'_5$ در آنزیم اتصال می‌یابند، و هیدرولیز پپتیدی بین $P_1 - P'_1$ (پیکان) رخ می‌دهد. جهت انتهای آمینوی زنجیر پلی‌پپتیدی سوبسترا با N و جهت انتهای کربوکسیل آن با C مشخص شده است.

توجهی کمتر از انواع خنثی هستند، تنها جایگاه کاتالیتیک (جایگاه اتصالی اولیه S_1) تعامل می‌کنند و **هدایت‌شده جایگاه- فعال**[1] نامیده می‌شوند. مطالعات انجام شده با سوبستراهای کوچک و مهارکننده‌ها نشان می‌دهند که جایگاه هیدرولیز در سوبستراهای پلی‌پپتیدی حدود چهار ریشه در هر دو طرف قرار دارد که به آنزیم اتصال یافته و بر روی واکنشگری پیوند هیدرولیزشونده تأثیر می‌گذارد. دو ریشه‌ای که در سوبسترا پیوند هیدرولیزشونده را ایجاد می‌کنند، به صورت $\mathbf{P_1 - P'_1}$ نشان داده می‌شوند. لذا در سوبستراهای تریپسینی ریشه P_1 لیزین یا آرژنین و در سوبستراهای کیموتریپسین یک اسید آمینه آبگریز خواهد بود. تعامل ریشه P_1 با جایگاه S_1، تعامل ابتدایی را بین سوبسترا و آنزیم برقرار می‌کند. سایر ریشه‌های اسید آمینه‌ای تعاملگر سوبسترای پروتئینی به ترتیب به صورت $P_4 - P_2$ و $P'_2 - P'_4$ در هر کدام از انتهای پیوند شکستنی مشخص می‌گردند. نواحی مکمل آنزیم که به این ریشه‌ها اتصال می‌یابند، به صورت $\mathbf{S_4 - S'_4}$ مشخص می‌گردند (شکل-۱۲-۹). **تعاملات ثانویه** با سوبسترا در خارج $S_1 - S'_1$ قرار دارند که نهایتاً یک ویژگی پروتئازی را در برابر یک سوبسترای پروتئینی خاص تعیین می‌کند. بر همین اساس، سرین پروتئاز انعقادی Xa پروترومبین را تنها در محل یک آرژنین خاص می‌شکند تا تولید ترومبین شود. این تعامل ثانویه است که به Xa امکان شناسایی آرژنین خاصی را می‌دهد که در پروترومبین می‌شکند. تعاملات $P_4 - P'_4$ با زیرجایگاه‌های[2] $S_4 - S'_4$ غیرکووالان هستند. جایگاه اتصالی توسعه‌یافته در سوبسترا با جایگاه اتصالی موجود در آنزیم در جهت تولید یک ساختمان صفحه β بین آنزیم و سوبسترا، تعامل می‌کند که پیوند پپتیدی شکستنی سوبسترا را در موقعیت $S_1 - S'_1$ قرار می‌دهد (شکل ۱۳-۹).

سرین پروتئازها به صورت زیموژن و در پروتئین‌های دومنی متعدد سنتز می‌شوند

سرین پروتئازها به صورت **زیموژن** سنتز می‌شوند که برای تولید آنزیم فعال نیاز به پروتئولیز محدودشده دارند. زیموژن‌های انعقادی در سلول‌های کبدی سنتز شده و برای فعال‌سازی بعدی به داخل گردش خون ترشح می‌شوند تا به دنبال آسیب عروقی توسط سایر سرین پروتئازها فعال شوند. زیموژن‌ها معمولاً با افزودن پسوند-وژن به نام آنزیم، برای مثال

1. Active-site directed 2. Subsites



شکل ۱۳-۹ نمایش شماتیک اتصال مهارکننده پانکراتیک تریپسین به تریپسین. ناحیه جایگاه اتصالی تریپسین (آبی) در کمپلکس با ناحیه‌ای از مهارکننده پانکراتیک تریپسین (قهوه‌ای) نشان داده شده است که مدلی برای اتصال یک سوبسترای پلی‌پپتیدی است. خطوط نقطه‌چین پیوندهای هیدروژنی هستند. این مهارکننده یک کونفورماسیون امتداد یافته دارد، طوری که اسیدهای آمینه P9، P7، P5، P3، و $P1-P_3'$ با زیرجایگاه‌های اتصالی S_5-S_3' تعامل می‌کنند. پیوند دارای پتانسیل تجزیه در مهارکننده بین P_1-P_1' (اسیدهای آمینه ۳۱۸ و ۳۱۹ که از آنها تنها Lys318 قابل مشاهده است) قرار دارد.

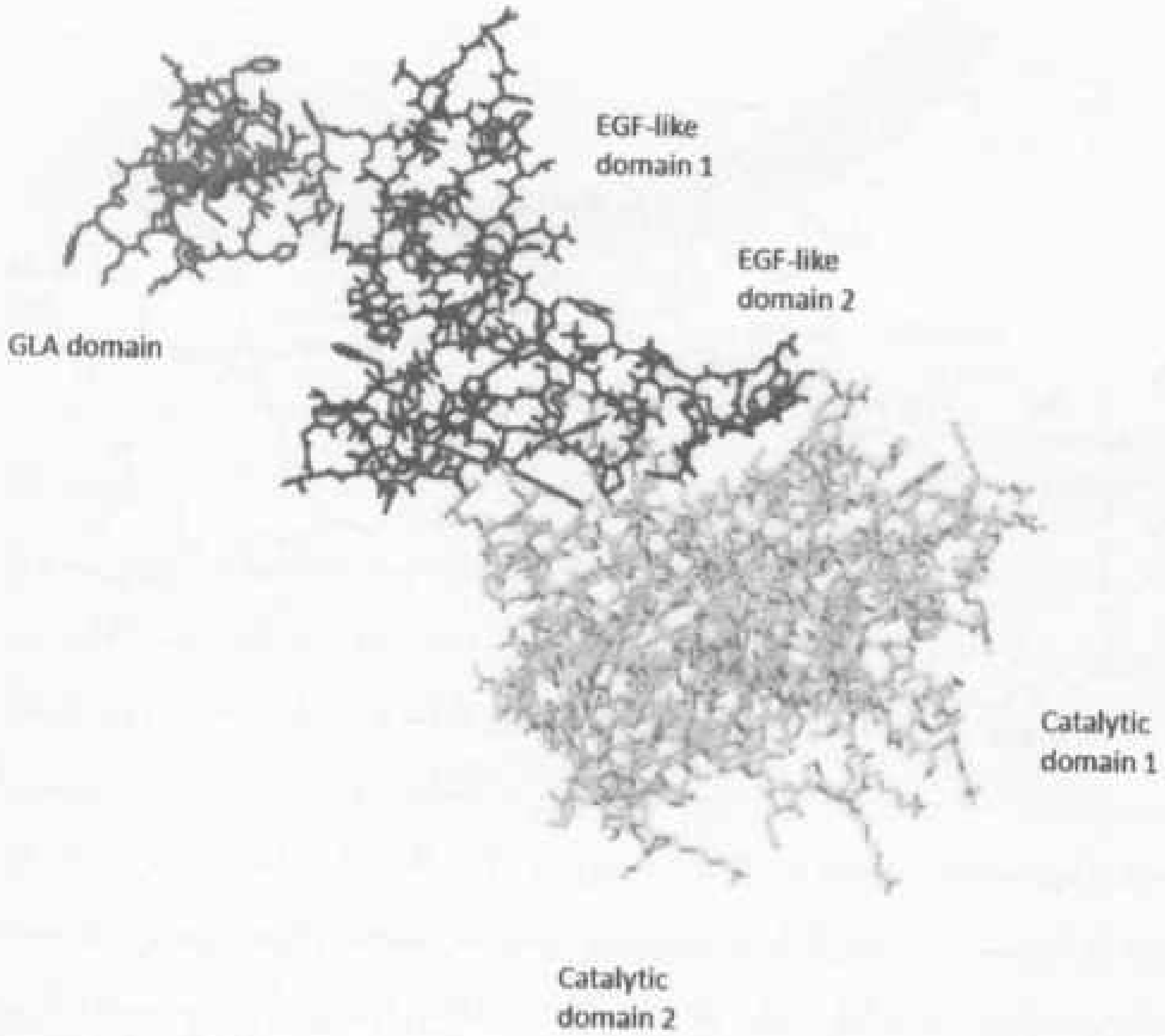
این شکل براساس انکسار اشعه X-کمپلکس مهارکننده پانکراتیک تریپسین با تریپسینوژن می‌باشد. ناحیه اتصالی تریپسینوژن موجود در این کمپلکس کونفورماسیونی را اتخاذ می‌کند که همانند کونفورماسیون تریپسین فعال متصل به یک سوبسترای پروتئینی است.

تریپسینوژن و کیموتریپسینوژن، مشخص می‌گردند. در برخی موارد، زیموژن را پروآنزیم گویند؛ برای مثال، زیموژن ترومبین، پروترومبین است.

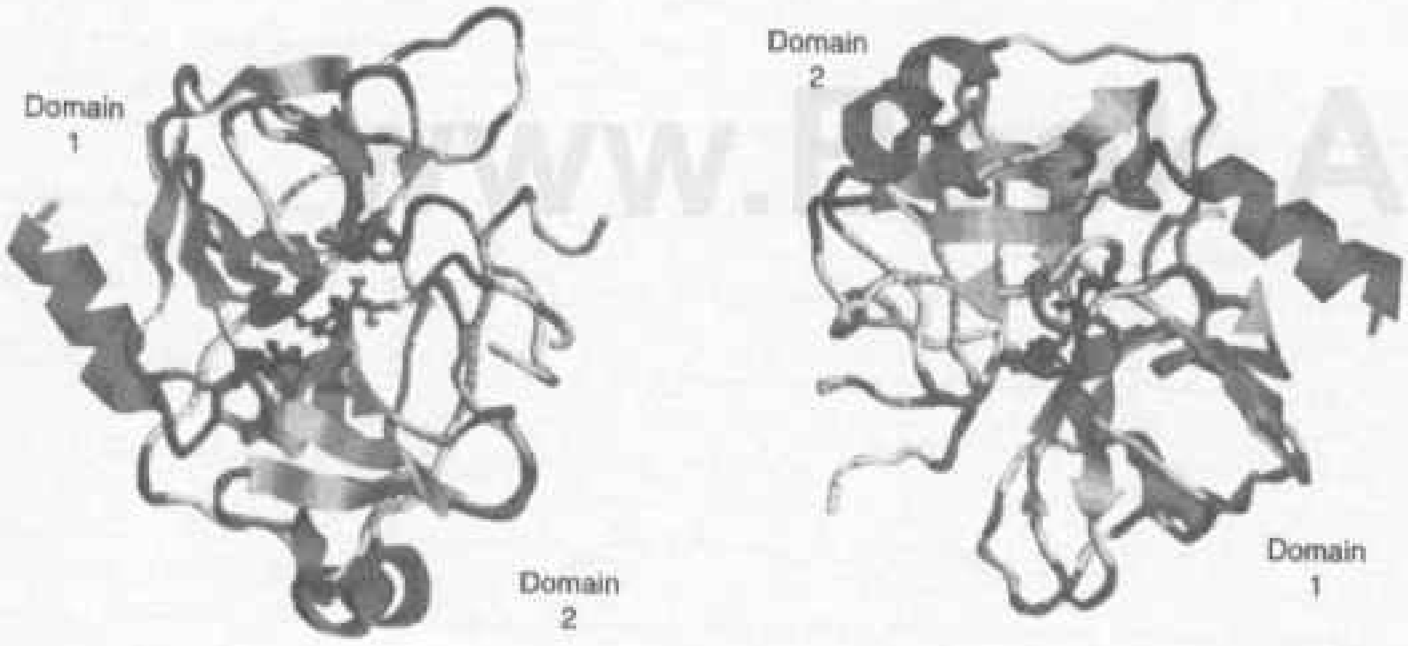
چندین سرین پروتئاز پلاسمایی اشکال زیموژنی دارند که حاوی **دومن‌های غیرمشابه متعدد** هستند. پروتئین C که در مسیر فیبرینولیز خون نقش دارد، حاوی چهار دومن مجزا می‌باشد (شکل ۱۴-۹). دومن انتهای آمینو حاوی مشتق اسید آمینه‌ای اسید γ- کربوکسی گلوتامیک است (شکل ۱۵-۹) که با کربوکسیلاسیون ریشه اسید گلوتامیک موجود در یک واکنش وابسته به ویتامین K تولید می‌شود (ص. ۱۳۱۳ و ۱۳۲۳). γ- کربوکسی گلوتامات Ca^{2+} را شلات (برداشت) می‌کند و قسمتی از جایگاهی را می‌سازد که به غشاء‌های سلولی اتصال می‌یابد. ناحیه انتهای کربوکسیل حاوی دومن‌های کاتالیتیکی است. فعال‌سازی زیموژن نیاز به تجزیه پیوند پپتیدی در خارج دومن کاتالیتیک دارد و تحت کنترل اتصال انتهای آمینوی حاوی γ-کربوکسی‌گلوتامات به یک جایگاه غشایی از طریق یون‌های کلسیم است.

ساختمان‌های سوم مربوط به دومن‌های کاتالیتیک سرین پروتئازها مشابه هستند

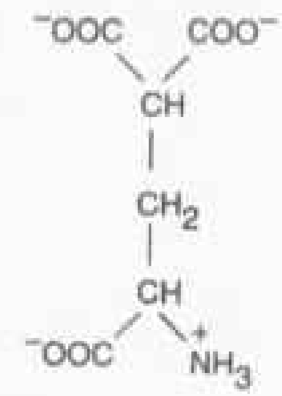
سرین پروتئازهای تریپسین-مانند یک فوق‌خانواده از پروتئین‌ها با دو دومن لوله β با همان فولد و اندازه برابر می‌باشند (شکل ۱۶-۹) که در یکدیگر نفوذ نمی‌کنند. نواحی قوسی از این ساختمان‌های لوله‌ای خارج می‌شوند که تقریباً به‌طور قرینه در دو دومن تـاشده نمایان می‌گردند. ایـن قوس‌ها ترکیب شده و تولید یک ناحیه سطحی می‌کنند



شکل ۱۴-۹ نمایش شماتیک ساختمان دومنی پروتئین C فعال‌شده که ساختمان چنددومنی را نشان می‌دهد. GLA اشاره به ریشه‌های اسید آمینه مشتق‌شده اسید γ-کربوکسی گلوتامیک موجود در انتهای دومن GLA (قرمز) دارد که در این محل به یون‌های کلسیم (کره‌های قرمز) اتصال می‌یابند. دومن‌های EGF-مانند (آبی) حاوی فولد موجود در فاکتور رشد اپیدرمی است، و دو دومن کاتالیتیک (زرد) آنزیم پروتئاز موجود در انتهای کربوکسیل این پروتئین را شامل می‌شوند.



شکل ۱۶-۹ دو نما از دومن‌های کاتالیتیکی تریپسین-مانند که ساختمان فولد لوله β دومن‌های دارای ریشه‌های جایگاه فعال را در فصل‌مشترک دومن نشان می‌دهند. رشته‌های β پیکان‌های زرد، ماریپچ‌های α به رنگ ماژنتا، پیچ‌ها به رنگ آبی کمرنگ و سایر ریشه‌ها سفید هستند. سرین ۱۹۵ جایگاه فعال (نارنجی)، هیستیدین ۵۷ (آبی) و آسپاراتات ۱۰۲ (قهوه‌ای مایل به قرمز) نشان داده شده‌اند.



شکل ۱۵-۹ ساختمان اسید آمینه مشتق‌شده اسید γ-کربوکسی گلوتامیک (با مخفف Gla) که در دومن انتهای آمینوی بسیاری از پروتئین‌های انعقادی یافت می‌شود.

که به سمت خارج و بالای جایگاه کاتالیتیک امتداد یافته و از نظر عملکرد مشابه CDRهای مربوط به ایمونوگلبولین‌ها می‌باشند. تعیین ساختمان توسط کریستالوگرافی اشعه X برای بسیاری از اعضاء خانواده پروتئینی سرین پروتئاز تریپسین-مانند، شامل اشکال آنزیمی فعال، زیموژن‌ها، یک آنزیم در گونه‌های متعدد، کمپلکس‌های آنزیم-مهارکننده، و یک آنزیم خاص در درجه حرارت‌های مختلف و در حلال‌های متفاوت، انجام شده است (جدول ۴-۹).

جدول ۴-۹ • ساختمان‌های مربوط به سرین پروتئازها که به‌طریق کریستالوگرافی اشعه - X تعیین شده‌اند.

آنزیم	گونه منبع	وجود مهارکننده‌ها	وضوح (Å)
کیموتریپسین[1]	گاو	بلی[2]	۱٫۶۷[3]
کیموتریپسینوژن	گاو	خیر	۲٫۵
الاستاز	خوک	بلی	۲٫۵
کالیکرئین	خوک	بلی	۲٫۰۵
پروتئیناز A	*S. griseus*	خیر	۱٫۵
پروتئیناز B	*S. griseus*	بلی	۱٫۸
پروتئیناز II	موش صحرایی	خیر	۱٫۹
تریپسین[1]	گاو	بلی[2]	۱/۴[3]
تریپسینوژن[1]	گاو	بلی[2]	۱/۶۵[3]

[1] ساختمان این ملکول آنزیم به‌طورمستقل توسط دو یا چند محقق تعیین شد.
[2] ساختمان بدون وجود مهارکننده (ساختمان طبیعی) و با وجود مهارکننده تعیین شد. مهارکننده‌های مورد استفاده شامل مهارکننده‌های با وزن ملکولی پایین (یعنی، بنزامیدین، DFP، و توسیل) و مهارکننده‌های پروتئینی (یعنی، مهارکننده تریپسین پانکراتیک گاو) بودند.
[3] بیشترین وضوح برای این ملکول از چندین تعیین ساختمان.

صف‌بندی ساختمان‌های سه-بُعدی را می‌توان بر روی سرین پروتئازها انجام داد. جدول ۵-۹ مجموعه‌هایی از دو پروتئاز، تعداد اسیدهای آمینه‌ای که در ساختمان‌های سه-بُعدی روی یکدیگر قرار می‌گیرند و تعدادی که از نظر شیمیایی در مقایسه توالی‌ها یکسان هستند، را نشان می‌دهد. حتی اگر اینها از نظر شیمیایی متفاوت باشند، براساس انکسار اشعه-X نمی‌توان آنها را از یکدیگر متمایز نمود. این پروتئین‌ها از نظر ساختمانی هُمولوگوس‌تر از توالی خود هستند. نواحی که بیشترین تفاوت را دارند، در نواحی قوس CDR-مانند می‌باشند. وقتی این قوس‌ها به تناوب قرار می‌گیرند، **ویژگی اتصال-ماکروملکولی** پروتئاز را تغییر می‌دهند. برای مثال، ساختمان این قوس در فاکتور Xa امکان اتصال اختصاصی

جدول ۵-۹ • انطباق ساختمانی سرین پروتئازهای خانواده تریپسینی انتخابی و توالی اسید آمینه‌ای مربوطه

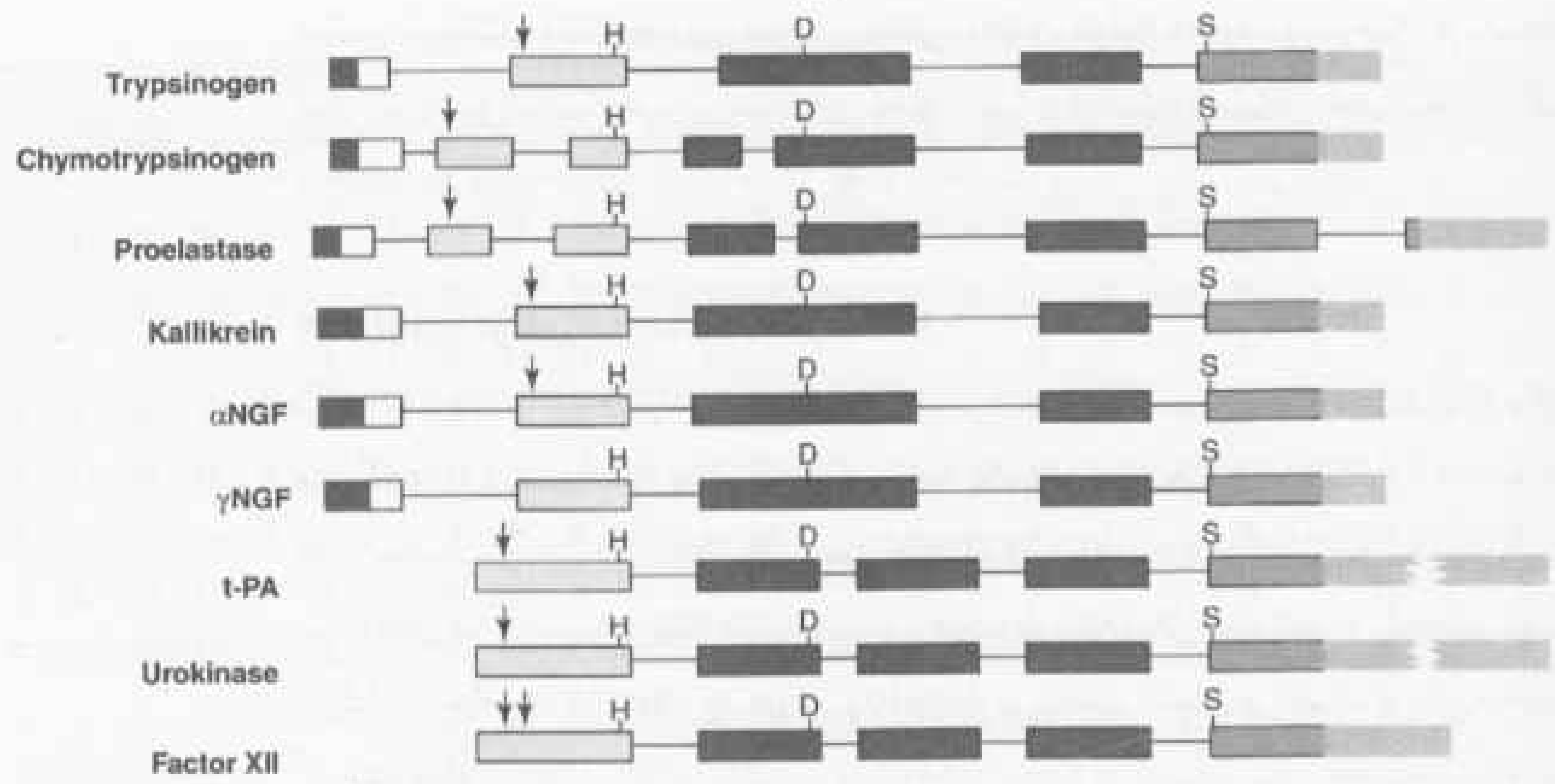
ترکیب	تعداد اسیدهای آمینه موجود در توالی		تعداد ریشه‌های معادل ساختمانی	تعداد ریشه‌های یکسان شیمیایی
	پروتئاز ۱	پروتئاز ۲		
Trypsin- elastase	۲۲۳	۲۴۰	۱۸۸	۸۱
Trypsin-chymotrypsin	۲۲۳	۲۴۱	۱۸۵	۹۳
Trypsin-mast cell protease	۲۲۳	۲۲۴	۱۸۸	۶۹
Trypsin-prekallikrein	۲۲۳	۲۳۲	۱۹۴	۸۴
Trypsin-S. *griseus* protease	۲۲۳	۱۸۰	۱۲۱	۲۵

اتصال اختصاصی به پروترومبین را فراهم می‌سازد. مهارکننده‌های پروتئازی از طریق تمایل خود به ساختمان‌های قوسی، با پروتئازهای مختلفی تعامل می‌کنند. پروتئازهای باکتریایی مرتبط با خانواده سرین پروتئازی اوکاریوتی، همان دو دومن را دارند، ولی فاقد اکثر قوس‌های دیگر هستند. این با عدم نیاز آنها به تعاملات پیچیده و مشاهده اینکه پروتئازهای باکتریایی به صورت زیموژن سنتز نمی‌شوند، سازگار است.

Ser-195 موجود در کیموتریپسین با مهارکننده دی‌ایزوپروپیل فلوروفسفات (DFP)، با استوکیومتری آنزیم: DFP برابر ۱:۱ واکنش می‌کند (ص ۴۶۶ و شکل ۱۱-۹). ساختمان سه-بُعدی کیموتریپسین آشکار می‌سازد که Ser-195 در داخل یک پاکت داخلی قرار دارد که به فصل مشترک حلال دسترسی دارد. His-57 و Asp-102 طوری قرار گرفته‌اند که همراه با Ser-195 در مکانیسم کاتالیتیک شرکت می‌کنند. لذا خانواده سرین پروتئازها، مجموعه‌ای از پروتئین‌ها با ارتباط ساختمانی را به وجود می‌آورند که یک سرین دارای فعالیت کاتالیتیکی را مورد استفاده قرار می‌دهند. طی دوره تکامل، ساختمان دو-دومنی پایه و ریشه‌های مهم کاتالیتیک حفظ شده‌اند، ولی نواحی مربوط به تعاملات ثانویه (نواحی قوس) تغییر یافته‌اند تا ویژگی‌های مختلف را در برابر سوبستراها، فعالگرها، و مهارکننده‌ها به‌وجود آورند که با نقش‌های فیزیولوژیکی متنوع آنها در ارتباط است.

سرین پروتئازها ارتباطات ساختمان- عملکرد مشابهی دارند

ارتباط بین ساختمان و عملکرد فیزیولوژیکی سرین پروتئازها به صورت زیر خلاصه می‌شود: (۱) تنها یک ریشه سرین فعالیت کاتالیتیکی دارد و در تجزیه پیوند پپتیدی شرکت می‌کند. تریپسین گاوی حاوی ۳۴ ریشه سرین است که از میان آنها فقط یک مورد دارای فعالیت کاتالیتیکی است و یا می‌تواند با مهارکننده DFP واکنش کند (شکل ۱۱-۹). (۲) مطالعات انکسار اشعه-x و هُمولوژی توالی نشان می‌دهند که همیشه یک هیستیدین و یک آسپارتات همراه با این سرین فعال‌شده در جایگاه کاتالیتیک وجود دارند. براساس موقعیت خود در کیموتریپسینوژن، این سه ریشه ثابت را Ser 195، His 57 و Asp 102 نامگذاری نموده و تریاد کاتالیتیک نامیده می‌شوند. از این شماره‌گذاری که براساس شماره توالی آنها در کیموتریپسینوژن است، برای شناسایی این ریشه‌ها بدون توجه به موقعیت دقیق آنها در هر سرین پروتئازی استفاده می‌شود. (۳) سرین پروتئازهای اوکاریوتی، شباهت بالای توالی و ساختمانی را نشان می‌دهند. (۴) ژن‌هایی کـه سرین پروتئازها را کد می‌کنند، به شکل مشابهی سازمانـدهی می‌شوند (شکل ۱۷-۹). **الگـوهای اگزون-اینترون** اینـها نشان می‌دهد که هر کـدام از ریشه‌های کاتالیتیکی ضروری (Ser-195، His-57 و Asp-102) بر روی یک اگزون متفاوت قرار دارند. هیستیدین و سرین ضروری همگی تقریباً در مجاورت مرز اگزونی خود قرار دارند. هُمولوژی بین‌گونه‌ای در ساختمان ژن، از این مفهوم حمایت می‌کنند که سرین پروتئازها از یک ژن ابتدایی مشتـرک به‌وجود آمده‌اند. (۵) قسمت کاتالیتیک



شکل ۱۷-۹ سازماندهی اگزون‌ها و اینترون‌ها در ژن‌های مربوط به سرین پروتئازها. t-PA فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن و NGF فاکتور رشد عصبی است که ساختمان هُمولوگوس با یک سرین پروتئاز دارد. اگزون‌ها به شکل جعبه و اینترون‌ها به صورت خطوط ارتباطی نشان داده شده‌اند. موقعیت کدون‌ها برای سرین، هیستیدین، و آسپارتات جایگاه- فعال به ترتیب توسط H ،S، و D نشان داده شده‌اند. جعبه‌های قرمز، در سمت چپ، نواحی را نشان می‌دهند که پپتید پیام انتهای آمینو راکد می‌کنند و قبل از ترشح شکسته می‌شوند. جعبه‌های با رنگ روشن، در سمت راست، اشاره به قسمتی از توالی ژنی دارند که به RNA پیک (mRNA) رونویسی می‌شوند، ولی به پروتئین ترجمه نمی‌گردند. پیکان‌ها کدون‌های مربوط به ریشه‌هایی را نشان می‌دهند که در آنها فعال‌سازی پروتئولیتیک زیموژن رخ می‌دهد.

سرین پروتئازها متشکل از دو دومن، با اندازه تقریباً برابر، می‌باشد. این جایگاه کاتالیتیک سرین در داخل فصل مشترک آنها یا در شکافی بین دو دومن قرار دارد. ساختمان سه- بُعدی این جایگاه کاتالیتیک در سرین پروتئازها مکمل ساختمان حالت انتقالی واکنش است و حاوی یک جایگاه اکسی‌آنیون جهت تثبیت حالت انتقالی واکنش هیدرولیز پپتیدی است. (۷)[1] سرین پروتئازهایی که با غشاءها تعامل می‌کنند، به‌طور شاخص یک دومن اضافی برای فراهم‌سازی این فعالیت اختصاصی دارند. (۸) سوبستراهای پروتئینی طبیعی و مهارکننده‌های سرین پروتئازها از طریق یک جایگاه ویژگی توسعه‌یافته اتصال می‌یابند. (۹) ویژگی مهارکننده‌های پروتئینی طبیعی با اتصال فوق‌العاده محکم مشخص می‌گردد. ثابت اتصال برای تریپسین به مهارکننده تریپسینی پانکراس حدود $10^{13}/M$ می‌باشد که انعکاسی از انرژی آزاد اتصالی حدود ۷۵ kJ/mol (۱۸ kcal/mol) می‌باشد. (۱۰) مهارکننده‌های پروتئینی طبیعی معمولاً سوبستراهای ضعیفی با اثر مهاری قوی هستند که برای هیدرولیز یک پیوند پپتیدی در مهارکننده توسط پروتئاز لازم دارند. (۱۱) سرین پروتئازهای موجود در اوکاریوت‌ها به صورت زیموژن سنتز می‌شوند تا امکان انتقال آنها به شکل غیرفعال به جایگاه فعالیت آنها فراهم گردد. (۱۲) برای فعال‌سازی زیموژنی اغلب نیاز به سرین پروتئاز

۱. در متن کتاب اصلی شماره (۶) آورده نشده است. مترجم

دیگری می‌باشد. (۱۳) چندین سرین پروتئاز متحمل **اتولیز** یا خود-هیدرولیز[1] می‌شوند گاهی این عمل سبب تجزیه پیوند پپتیدی اختصاصی و فعال‌سازی بیشتر فعالیت کاتالیتیک می‌شود. در موارد دیگر، اتولیز منجر به غیرفعال‌سازی این پروتئاز می‌گردد.

هُمولوژی توالی در سرین پروتئازها

بیشتر شناخت اولیه خانواده سرین پروتئاز از تریپسین و کیموتریپسین تخلیص‌شده از مواد گاوی به دست آمده است. این سبب تهیه یک فهرست مفید و استدلالی شده است که از صف‌بندی توالی در برابر توالی اسید آمینه‌ای کیموتریپسین، نامگذاری و شماره‌گذاری ریشه‌های سایر سرین پروتئازها شده است. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، ریشه‌های مهم کاتالیتیک شامل Ser-195، His-57 و Asp-102 می‌باشند. الحاق و حذف این اسیدهای آمینه در سایر سرین پروتئازها با شماره ریشه‌های موجود در کیموتریپسین مقایسه می‌شوند. صف‌بندی توسط الگوریتم‌هایی ساخته می‌شود که هُمولوژی توالی را، با صف‌بندی دقیق ریشه‌های سرین، هیستیدین و آسپارتات ضروری، به حداکثر می‌رسانند. این سه ریشه در تمامی سرین پروتئازها ثابت هستند و توالی‌های احاطه‌کننده آنها در بین سرین پروتئازهای خانواده تریپسینی ثابت می‌باشند (جدول ۶-۹).

اعضاء خانواده تریپسین همچنین در پروکاریوت‌ها وجود دارند. برهمین اساس، سرین پروتئازهای باکتریایی مربوط به ***Streptomyces griseus*** و ***Myxobacteria* 450** با تریپسین هُمولوگوس هستند. هرچند، یک کلاس مجزای سرین پروتئازها که ابتدا در باکتری‌ها کشف شد، هُمولوژی ساختمانی با خانواده تریپسینی پستاداران نداشت. سرین پروتئاز سوبتیلین که از ***Bacillus subtilis*** جدا شده است، پیوندهای پپتیدی را هیدرولیز می‌کند و در جایگاه فعال یک سرین فعال‌شده با یک هیستیدین و آسپارتات به همراه یک مکمل ساختمانی جایگاه فعال با حالت انتقالی واکنش هیدرولیتیک دارد، ولی پیدایش جایگاه فعال آن از نواحی ساختمانی پروتئین است که هیچ هُمولوژی توالی یا ساختمانی با خانواده تریپسینی ندارد. سرین پروتئازهای خانواده سوبتیلینی در سلول‌های انسانی نیز یافت می‌شوند. این مثالی از **تکامل همگرا**[2] یک مکانیسم کاتالیتیکی آنزیم است. به شکل واضحی، یک ژن کاملاً متفاوت همان مکانیسم کاتالیتیکی را برای هیدرولیز پپتیدی ارائه نموده است.

مکانیسم کاتالیز سرین پروتئازی

تمامی سرین پروتئازهای تریپسین-مانند، هیدرولیز پیوند پپتیدی را با یک مکانیسم کاتالیتیکی یکسان کاتالیز می‌کنند که با همکاری Ser-195، His-57 و Asp-102 جایگاه فعال می‌باشد. این ریشه‌ها در دومن‌های مختلفی از دو دومنی قرار دارند که واحد کاتالیتیک را می‌سازند. در پروتئین تاشده، ساختمان‌های سه-بُعدی این ریشه‌ها را در کنار یکدیگر

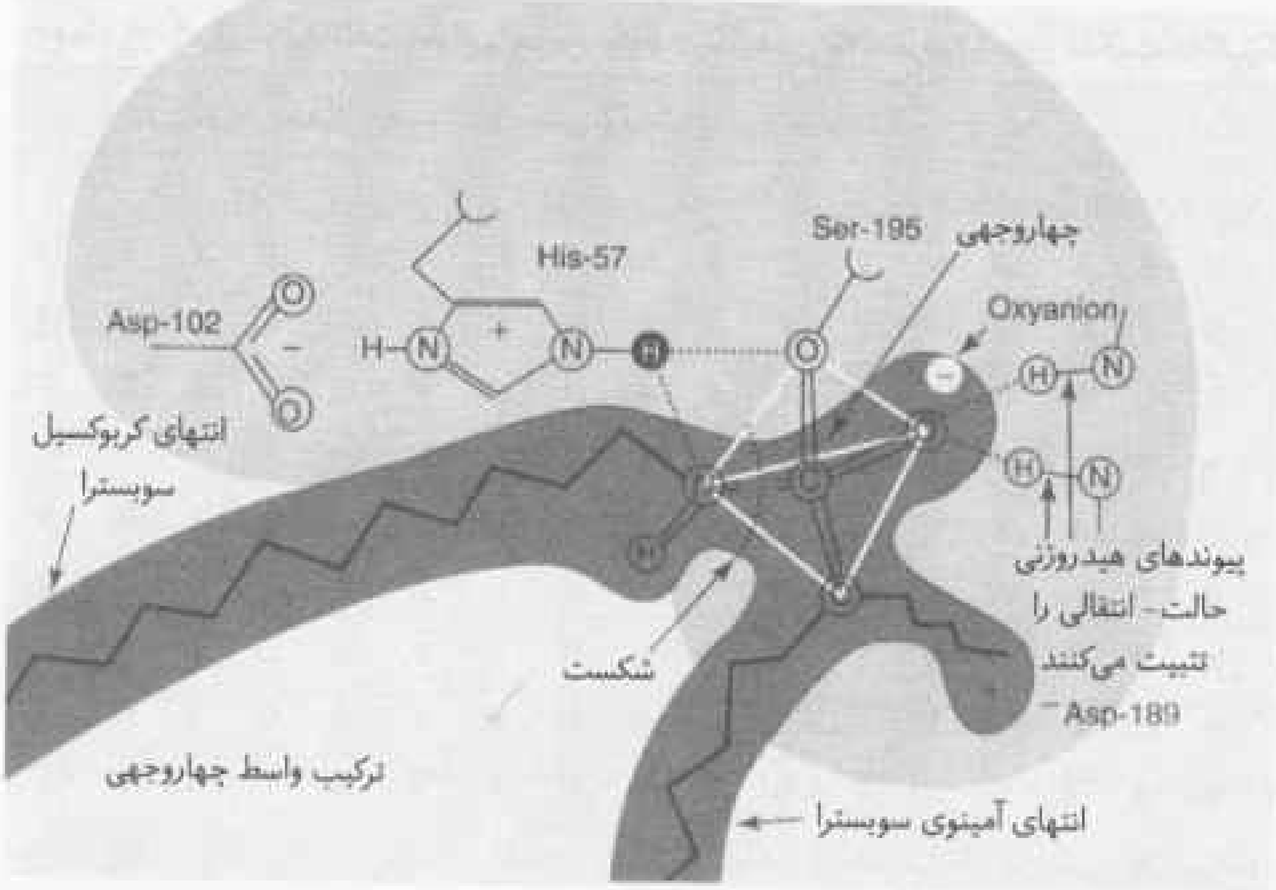
1. Self-hydrolysis 2. Convergent evolution

جدول ۶-۹ • توالی ثابت اطراف سرین (S) و هیستیدین (H) ضروری برای فعالیت کاتالیتیک

آنزیم	توالی (ریشه‌های یکسان با کیموتریپسین تیره هستند)																							
	ریشه‌های اطراف هیستیدین ضروری برای فعالیت کاتالیتیک																							
Chymotrypsin A	F	H	F	C	G	G	S	L	I	N	E	N	W	V	V	T	A	A	H	C	G	V	T	T	S	D
Trypsin	Y	H	F	C	G	G	S	L	I	N	S	Q	W	V	V	S	A	A	H	C	Y	K	S	G	I	Q
Pancreatic elastase	A	H	T	C	G	G	T	L	I	R	Q	N	W	V	M	T	A	A	H	C	V	D	R	E	L	T
Thrombin	E	L	L	C	G	A	S	L	I	S	D	R	W	V	L	T	A	A	H	C	L	L	Y	P	P	W
Factor X	E	G	F	C	G	G	T	I	L	N	E	F	Y	V	L	T	A	A	H	C	L	H	Q	A	K	R
Plasmin	M	H	F	C	G	G	T	L	I	S	P	E	W	V	L	T	A	A	H	C	L	E	K	S	P	R
Plasma kallikrein	S	F	Q	C	G	G	V	L	V	N	P	K	W	V	L	T	A	A	H	C	K	N	D	N	Y	E
Streptomyces trypsin	–	–	–	C	G	G	A	L	Y	A	Q	D	I	V	L	T	A	A	H	C	V	S	G	S	G	N
Subtilisin	V	G	G	A	S	F	V	A	G	E	A	Y	N	T	D	G	N	G	H	G	T	H	V	A	G	T
	ریشه‌های اطراف سرین ضروری برای فعالیت کاتالیتیک																							
Chymotrypsin A	C	A	G	–	–	–	A	S	G	V	–	–	S	S	C	M	G	D	S*	G	G	P	L	V
Trypsin	C	A	G	Y	–	–	L	E	G	G	K	–	D	S	C	Q	G	*D*	S	G	G	*P*	V	V
Pancreatic elastase	C	A	G	–	–	–	G	N	G	V	R	–	S	G	C	Q	G	D	S	G	G	P	L	H
Thrombin	C	A	G	Y	K	P	G	E	G	K	R	G	D	A	C	E	G	D	S	G	G	P	F	V
Factor X	C	A	G	Y	–	–	D	T	Q	P	E	–	D	A	C	Q	G	D	S	G	G	P	H	V
Plasmin	C	A	G	H	–	–	L	A	G	G	T	–	D	S	C	Q	G	D	S	G	G	P	L	V
Plasma kallikrein	C	A	G	Y	–	–	L	P	G	G	K	–	D	T	C	M	G	D	S	G	G	P	L	I
Streptomyces trypsin	C	A	G	Y	–	P	D	T	G	G	V	–	D	T	C	Q	G	D	S	G	G	P	M	F
Subtilisin	A	G	V	Y	S	T	Y	P	T	N	T	Y	A	T	L	N	G	T	S	M	A	S	P	H

در دومن فصل‌مشترکی قرار می‌دهند که جایگاه اولیه کاتالیز را تشکیل می‌دهد (شکل ۱۸-۹). نیتروژن‌های ایمیدازول ریشه‌هایHis-57 پیوندهای هیدروژنی را با Ser − 195γOH و با کربوکسیلات زنجیر جانبی Asp-102 به‌وجود می‌آورند. در هیدرولیز کاتالیزشده توسط پروتئاز، این هیستیدین به‌عنوان یک کاتالیست باز عمومی عمل کرده و O^{γ} سرین یک ترکیب واسط استر کووالان موقتی با قسمتی از سوبسترا به‌وجود می‌آورد. این مکانیسم‌ها که با همکاری Ser-195 و His-57 می‌باشند، تجزیه پیوند پپتیدی شکستنی سوبسترای اتصال‌یافته به جایگاه فعال را تسریع می‌کنند.

علاوه بر سه اسید آمینه جایگاه فعال که برای کاتالیز ضروری هستند، تمامی جایگاه‌های فعال خصوصیاتی دارند که ساختمان حالت انتقالی واکنش را تثبیت می‌کنند. حالت انتقالی، ساختمانی در مسیر واکنش با بیشترین انرژی است که سوبسترا به آن می‌رسد. سرعت واکنش وابسته به انرژی مورد نیاز برای رسیدن به ساختمان حالت انتقالی است و آنزیم از طریق کاهش انرژی مورد نیاز برای رسیدن به ساختمان حالت انتقالی، واکنش را تسریع می‌کند. یکی از راه‌های کاهش این انرژی، تثبیت ساختمان حالت انتقالی هیدرولیتیک می‌باشد. تمامی جایگاه‌های فعال مربوط به سرین پروتئازها حاوی دو گروه دهنده پیوند



شکل ۱۸-۹ تثبیت ساختمان حالت انتقالی واکنش هیدرولیز پپتیدی توسط تریپسین. سوبسترای پلی‌پپتیدی به رنگ قرمز با اتم‌های کربن α، زنجیر جانبی (لیزین)، و پیوند پپتیدی پایدار ریشه P_1 موجود در سوبسترا نشان داده شده است. پیوند پپتیدی ناپایدار یک ساختمان واسط همانند ساختمان حالت انتقالی واکنش فرضی است که در آن پیوند کربن کربونیل به نیتروژن پیوند پپتیدی در حال تجزیه است، در حالی‌که پیوند بین O^{γ} Ser-195 و کربن کربونیل در حال ایجاد می‌باشد. در این ساختمان، کربن کربونیل به‌طور گذرا به چهار اتم مختلف اتصال پیدا می‌کند و اکسیژن کربونیل دارای بار منفی است. جایگاه فعال آنزیم به رنگ آبی است و حاوی Ser-195، His-57، و Asp-102 می‌باشد که از نظر کاتالیتیکی ضروری هستند. زنجیر پلی‌پپتیدی جایگاه فعال آنزیم در ایجاد دو پیوند هیدروژنی نقش دارد که سبب تثبیت ساختمان حالت انتقالی می‌شود.

هیدروژنی هستند که در موقعیت مناسبی برای دادن پیوندهای هیدروژنی قرار دارند که سبب تثبیت ساختمان حالت انتقالی می‌شود (شکل ۱۸-۹). قرارگیری دقیق این گروه‌های دهنده پیوند هیدروژنی، در داخل جایگاه فعال، یک خصوصیت ساختمانی مهم کاتالیز آنزیم‌های پروتئاز است.

مهارکننده‌های پروتئینی اختصاصی سرین پروتئازها

پیدایش خانواده پروتئاز سرینی برای شرکت در فرایندهای فیزیولوژیکی سبب تسریع در پیدایش موازی مهارکننده‌ها شده است. پروتئین‌های اختصاصی سبب مهار فعالیت سرین پروتئازها در زمانی می‌شوند که نقش فیزیولوژیکی آنها به پایان رسیده است (جدول ۷-۹). به همین دلیل، انعقاد محدود به محل آسیب رگ است و فعال‌سازی کمپلمان منجر به لیز تنها سلول‌هایی می‌شود که آنتی‌ژن‌های خارجی را به نمایش می‌گذارند. ناتوانی در کنترل این پروتئازها، نظیر کمبود یک مهارکننده اختصاصی، می‌تواند منجر به عوارض ناخواسته‌ای، نظیر تولید ترومبوس همراه با شروع آنفارکتوس میوکارد و سکته یا واکنش‌های کنترل‌نشده کمپلمان در بیماری خودایمنی، شود. این مهارکننده‌های طبیعی سرین پروتئازها را **سرپین**[1] گویند که اشاره به مهارکننده‌های سرین پروتئاز[2] دارد. این مهارکننده‌ها در حیواناتی وجود دارند که تولید پروتئاز می‌کنند، ولی به‌شکل تعجب‌آوری در گیاهان نیز وجود دارند که فاقد پروتئازها هستند.

۹-۴ • هموگلوبین و میوگلوبین

هموگلوبین‌ها پروتئین‌های کروی هستند که با غلظت بالا در گلبول‌های قرمز خون وجود دارند که در ریه‌ها به اکسیژن اتصال می‌یابند و آن را به سلول‌های بافتی انتقال می‌دهند.

1. Serpin 2. Serine protease inhibitors

جدول ۷-۹ • برخی پروتئین‌های انسانی که سرین پروتئازها را مهار می‌کنند

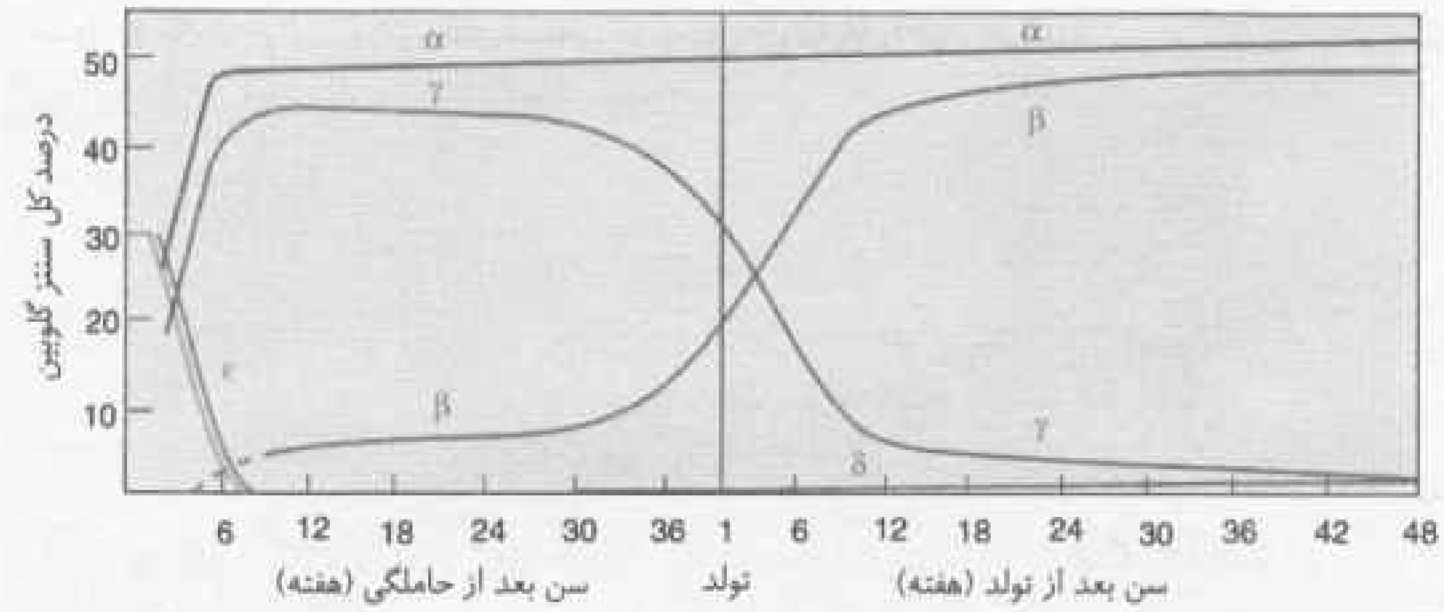
مهارکننده	فعالیت
مهارکننده α_1- پروتئیناز	مهار پروتئازهای بافتی شامل الاستاز نوتروفیلی؛ کمبود آن منجر به آمفیزم ریوی می‌شود
α_1 - آنتی‌کیموتریپسین	مهار پروتئازهای با ویژگی کیموتریپسین- مانند از نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها، و ماست سل‌ها شامل کاتپسین G و کیماز
مهارکننده اینتر - α - تریپسین	دامنه وسیعی از فعالیت‌های سرین پروتئازی را در پلاسما مهار می‌کند
α_2 - آنتی‌پلاسمین	مهار پلاسمین
آنتی‌ترومبین III	مهار ترومبین و سایر پروتئازهای انعقادی
مهارکننده C_1	مهار واکنش کمپلمان
α_2 - ماکروگلبولین	مهارکننده پروتئاز عمومی
پروتئاز نِکسین I	مهار ترومبین، فعال‌کننده پلاسمینوژن اوروکیناز، و پلاسمین
پروتئاز نِکسین II	مهار سرین پروتئازهای مرتبط با فاکتور رشد، یکسان با دومن انتهای آمینو پروتئین آمیلوئید ترشحی در بیماری آلزایمر
مهارکننده فعال‌کننده پلاسمینوژن I	مهار فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن
مهارکننده فعال‌کننده پلاسمینوژن II	مهار فعال‌کننده پلاسمینوژن اوروکیناز

هموگلوبین‌ها همچنین CO_2 و H^+ را از بافت‌ها به ریه‌ها می‌برند و اکسید نیتریک ($NO^•$) را حمل و در عروق خونی بافت‌ها آزاد می‌کنند. NO یک متسع‌کننده عروقی قوی و مهارکننده تجمع پلاکتی است. ساختمان ملکولی و شیمی هموگلوبین‌ها بخوبی برای این فعالیت‌های فیزیولوژیک پیچیده و مرتبط با یکدیگر مناسب می‌باشد.

چندین شکل هموگلوبین در انسان وجود دارد

ملکول هموگلوبین حاوی چهار زنجیر پلی‌پپتیدی، دو زنجیر از هر کدام از دو توالی متفاوت، است. هر زنجیر یک گروه پروستتیک هِم دارد که به اکسیژن اتصال می‌یابد. با اتصال O_2 به ملکول هموگلوبین در جهت تولید $Hb(O_2)_4$، چهار جایگاه اتصالی O_2 به صورت تعاونی[1] عمل می‌کنند. شکل اصلی هموگلوبین بالغین، **HbA_1** شامل دو زنجیر α و دو زنجیر β $(\alpha_2\beta_2)$ می‌باشد. پلی‌پپتید α حاوی ۱۴۱ و پلی‌پپتید β حاوی ۱۴۶ اسید آمینه است. شکل جنینی **(HbF)** (شکل ۱۹-۹) حاوی همان زنجیر α موجود در HbA_1 است، ولی زنجیرهای γ آن از نظر توالی متفاوت با زنجیر β می‌باشد (جدول ۸-۹). دو هموگلوبین دیگر در ماه‌های اولیه حاملگی (رویانی) ظاهر می‌شوند که در آنها زنجیرهای α توسط

1. Cooperative



شکل ۱۹-۹ تغییرات تولید زنجیر گلوبینی طی نمو.

جدول ۸-۹ • زنجیرهای هموگلوبینی انسان

مرحله نمو	سمبل	ترکیب زنجیری
بالغین	HbA_1	$\alpha_2\beta_2$
بالغین	HbA_2	$\alpha_2\delta_2$
جنینی	HbF	$\alpha_2\gamma_2$
رویانی	HbGower−1	$\zeta_2\epsilon_2$
رویانی	HbPortland	$\zeta_2\gamma_2$

زنجیرهای زتا (ζ) با توالی متفاوت جایگزین شده و زنجیرهای ε به‌عنوان زنجیرهای β عمل می‌کنند. شکل جزئی از هموگلوبین بالغین، یعنی $\mathbf{HbA_2}$، حدود ۲٪ هموگلوبین بالغین طبیعی را تشکیل می‌دهد و شامل دو زنجیر α و دو زنجیر دلتا (δ) می‌باشد (جدول ۸-۹). هموگلوبین‌های غیرطبیعی در ارتباط بالینی ۶-۹ مورد بحث قرار گرفته‌اند.

میوگلوبین: یک پلی‌پپتید واحد با یک جایگاه اتصال به O_2

میوگلوبین (Mb) یک پروتئین اتصالی O_2 است که با تغییر غلظت O_2 در سارکوپلاسم سلول‌های عضله اسکلتی، O_2 را برداشت و آزاد می‌کند. برخلاف هموگلوبین که چهار زنجیر و چهار جایگاه اتصالی برای O_2 دارد، میوگلوبین تنها یک زنجیر پلی‌پپتیدی و یک جایگاه اتصالی O_2 دارد. میوگلوبین به‌عنوان مدلی برای حالتی است که در آن یک ملکول پروتومر واحد به‌تنهایی و بدون تعاملات مربوط به چهار زیرواحد اتصال به O_2 موجود در ملکول تترامر پیچیده‌تر هموگلوبین، فعالیت می‌کند.

گروه پروستتیک هِم جایگاه اتصال به O_2 است

هر کدام از چهار زیرواحد گلوبین موجود در هموگلوبین و یک زیرواحد موجود در میوگلوبین، یک گروه پروستتیک هِم دارند. یک **گروه پروستتیک**[1] یک بخش غیرپلی‌پپتیدی است که

1. Prosthetic group

ارتباط بالینی ۹-۶

هموگلوبینوپاتی‌ها

بیش از ۸۰۰ هموگلوبین انسانی جهش‌یافته وجود دارد. جهش سبب ناپایداری ساختمان هموگلوبین، افزایش یا کاهش تمایل به اکسیژن، یا افزایش سرعت اکسیداسیون آهن فرو (Fe^{2+}) هِم به حالت فریک (Fe^{3+}) می‌شود. هموگلوبین غیرفعال فریک را متهموگلوبین گویند و به صورت HbM نشان داده می‌شود.

هموگلوبین ناپایدار می‌تواند در اثر جایگزینی پرولین به‌جای یکی از اسیدهای آمینه موجود در ناحیه مارپیچی α فولد گلوبین حاصل شود. پرولین‌ها در ساختمان مارپیچی α شرکت نمی‌کنند و قطع قطعه مارپیچی α سبب تولید یک هموگلوبین ناپایدار (برای مثال $Hb_{Skai}^{\beta Leu14\to Pro}$ و $Hb_{Genova}^{\beta 28Leu\to Pro}$) می‌شود. سایر هموگلوبین‌های ناپایدار حاصل جایگزینی یک اسید آمینه بسیار بزرگ یا بسیار کوچک هستند که نمی‌تواند تماس مناسب را برقرار کند و یا این که نتیجه قرارگیری یک گروه باردار یا قطبی در داخل یک دومن می‌باشند. هموگلوبین‌های ناپایدار به راحتی دناتوره می‌شوند و ممکن است به شکل اجسام هینز[1] رسوب کنند که به غشاء گلبول قرمز آسیب وارد می‌کنند. مبتلایان به هموگلوبین‌های ناپایدار دچار کم‌خونی، رتیکولوسیتوز، بزرگی طحال و اوروبیلینوری (دفع اوروبیلین در ادرار) می‌شوند.

برخی هموگلوبین‌های جهش‌یافته افزایش تمایل به اکسیژن (P_{50} پایین) را دارند. $Hb_{Cowtwon}^{\beta His146\to Leu}$ نمونه جالبی است که در آن هیستیدینی که ۵۰٪ پروتون‌های اثر بوهر را می‌دهد، از دست رفته است. این جهش مانع تنظیم تفکیک اکسیژن توسط غلظت یون هیدروژن و ناپایداری کونفورماسیون T نسبت به کونفورماسیون R می‌شود که نتیجه افزایش تمایل به اکسیژن و کاهش آزادسازی O_2 در بافت‌ها می‌باشد. جهش‌های هموگلوبینی که اتصال BPG را مختل می‌کنند نیز تمایل به اکسیژن را افزایش می‌دهند. هموگلوبینوپاتی‌های همراه با افزایش تمایل به اکسیژن اغلب با کم‌خونی همولیتیک و تولید اجسام هینز مشخص می‌شوند.

هموگلوبین‌های جهش‌یافته‌ای که تولید متهموگلوبین می‌کنند شامل $HbM_{Iwate}^{\alpha 87His\to Tyr}$ و $HbM_{HydePark}^{\beta 92His\to Tyr}$ می‌باشند که در آنها هیستیدین پروگزیمال F8 در به ترتیب زنجیرهای α و β جهش یافته‌اند. در $HbM_{Boston}^{\alpha 58His\to Tyr}$ و $HbM_{Saskatoon}^{\beta 63His\to Tyr}$ هیستیدین‌های دیستال E7 جهش یافته‌اند. جهش‌های مربوط به اسیدهای آمینه‌ای که در برابر هِم متراکم می‌شوند یا جایگاه اتصال به اکسیژن را به‌وجود می‌آورند، اغلب منجر به متهموگلوبینمی می‌شوند. مبتلایان به غلظت‌های بالای متهموگلوبین دچار سیانوز (رنگ مایل به آبی پوست) می‌شوند.

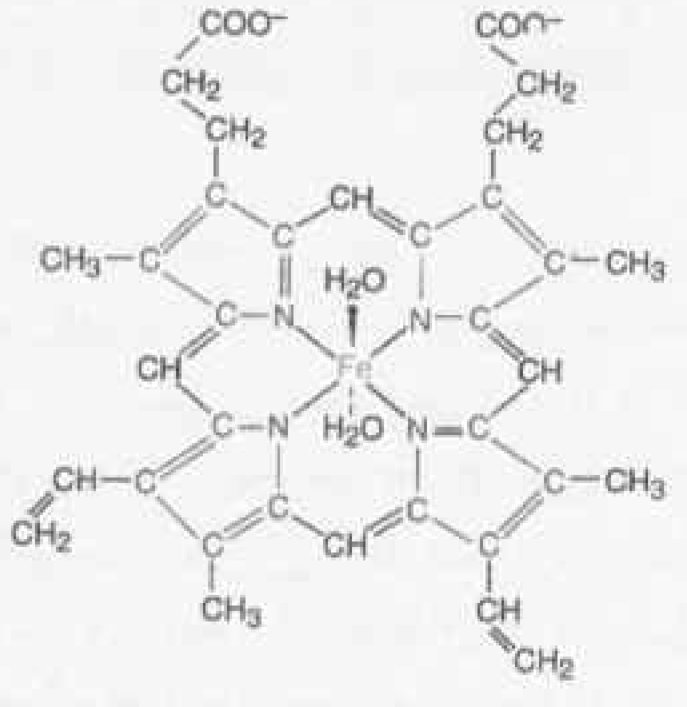
دو مورد از شایع‌ترین جهش‌ها در یک موقعیت اسید آمینه‌ای، β6Glu، رخ می‌دهند. وقتی گلوتامات توسط والین جایگزین می‌شود، نتیجه $HbS^{\beta 6Glu\to Val}$ می‌باشد، درحالی که جایگزینی با لیزین تولید $HbC^{\beta 6Glu\to Lys}$ می‌کند. هموزیگوت‌های مبتلا به HbS دچار کم‌خونی داسی‌شکل هستند که در آن ملکول‌های هموگلوبین به‌صورت اجسام امتدادیافته یا آرایش‌های بلند رسوب می‌کنند که به گلبول قرمز شکل داسی را می‌دهد. HbC ساختمان تجمع‌یافته دیگری متشکل از کریستالوئیدهایی با انتهای صاف را به‌وجود می‌آورند. این باعث کاهش زمان بقاء گلبول‌های قرمز خون می‌شود که در مقایسه با HbS، همولیز کمتری را تولید می‌کند. این شکل هموگلوبینوپاتی‌ها اثرات پاتولوژیکی کمتری را به همراه دارد. از آنجایی‌که هم HbS و هم HbC معمولاً در برخی جمعیت‌های سیاهپوستان آفریقا شایع هستند، یافتن افراد هتروزیگوس هر دو ژن جهش‌یافته در این جمعیت‌ها غیرمعمول نیست. افرادی که HbSC دارند، دچار نوعی کم‌خونی حدواسط بین کم‌خونی مشاهده‌شده در هموزیگوت‌های HbS و HbC هستند.

1. Heinz bodies

یک بخش وظیفه‌دار یک پروتئین را تشکیل می‌دهد. بدون گروه پروستتیک مربوطه، پروتئین را **آپوپروتئین**[1] گویند. همراه با گروه پروستتیک خود، این پروتئین **هولوپروتئین**[2] نامیده می‌شود.

در هموگلوبین‌ها و میوگلوبین، هِم پروتوپورفیرین IX (ص. ۱۰۵۹) می‌باشد که یک اتم آهن در مرکز آن وجود دارد (شکل ۲۰-۹). در هموگلوبین و میوگلوبین وظیفه‌دار، آهن در وضعیت فرو (بار ۲+) قرار دارد که برحسب اتصال یا عدم اتصال O_2، می‌تواند پنج یا

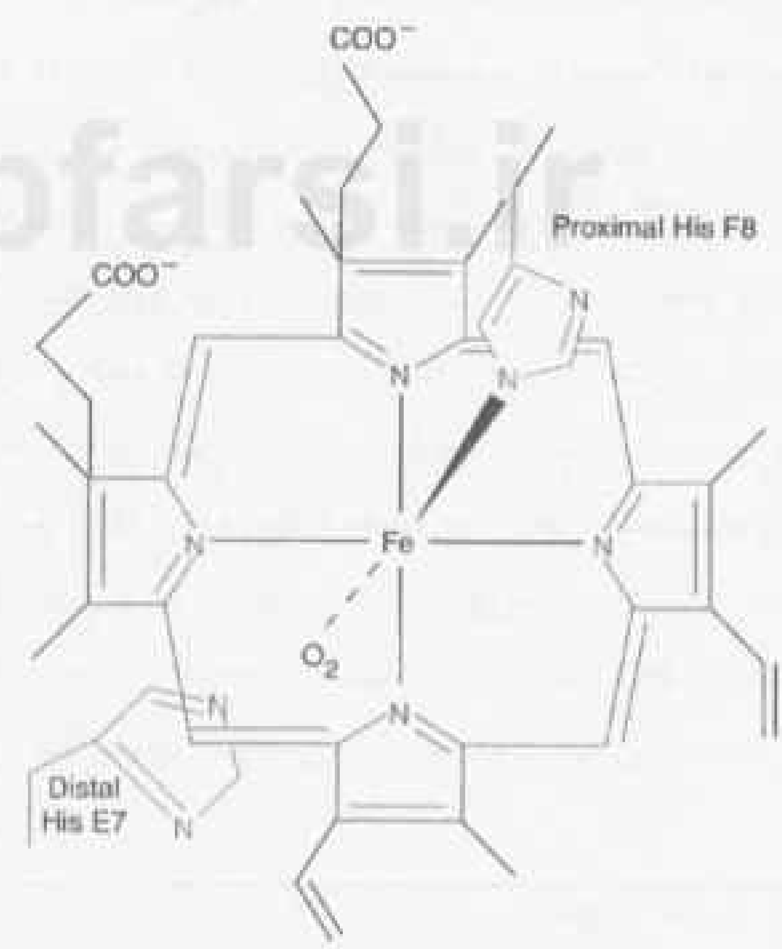
1. Apoprotein   2. Holoprotein



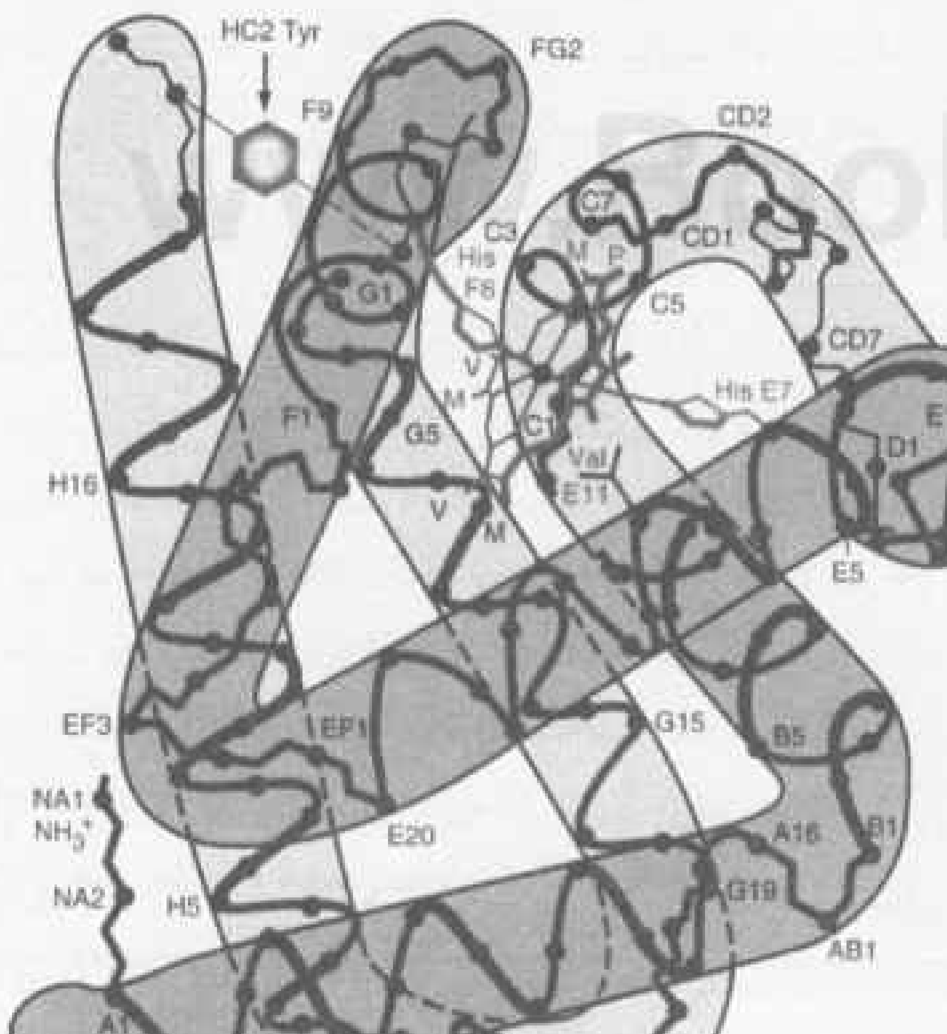
شکل ۲۰-۹ **ساختمان هِم.** آهن (Fe^{2+}) چهار پیوند با نیتروژن‌های پیرولی موجود در پورفیرین مسطح دارد. پیوندهای پنج و شش عمود بر صفحه پورفیرین هستند. ساختمان پورفیرین، پروتوپورفیرین نوع IX می‌باشد.

شش پیوند کووالان برقرار کند. چهار پیوند با اتم‌های نیتروژن پیرولی پورفیرین است. از آنجایی که حلقه‌های پیرولی و اتم‌های کربن متصل‌کننده آنها قسمتی از یک سیستم آروماتیک هستند، این اتم‌ها در یک صفحه قرار دارند. Fe^{2+} متصل به پورفیرین تمایل دارد تا در این صفحه پورفیرینی قرار گیرد. پنجمین و ششمین پیوند پتانسیل به Fe^{2+} در طول محور عمود بر صفحه حلقه پورفیرین قرار دارند (شکل ۲۱-۹). پنجمین پیوند به نیتروژن ایمیدازول یک هیستیدین است. این هیستیدین را در ساختمان گلوبینی **هیستیدین نزدیک**[1] می‌نامند (شکل ۲۱-۹ و ۲۲-۹). در اکسی-گلوبین‌ها، O_2 ششمین پیوند را تشکیل می‌دهد که در آن O_2 بین اتم فرو و ایمیدازول هیستیدین دوم، تحت عنوان **هیستیدین دور**[2]، قرار می‌گیرد. در داکسی- گلوبین‌ها، موقعیت ششم اشغال‌نشده می‌باشد.

هِم در داخل یک پاکت آبگریز هر کدام از زیرواحدهای گلوبینی قرار دارد. در این پاکت حدود ۱۸ ریشه اسید آمینه وجود دارند که اکثراً بین زنجیرهای جانبی غیرقطبی و نواحی غیرقطبی پورفیرین می‌باشند که امکان ایجاد حدود ۸۰ تعامل را فراهم می‌سازند. نیروی پیشبرنده برای تعامل، دفع آب حلالیت به‌دنبال پیوستن هِم آبگریز به زنجیرهای



شکل ۲۱-۹ **پیوندهای لیگاندی به اتم فرو در اکسی‌هموگلوبین.**



شکل ۲۲-۹ **ساختمان دوم و سوم مشخص گلوبین‌های هموگلوبین.** زنجیرهای جانبی مربوط به His F8 نزدیک، His F7 دور، Tyr HC2 و Val E11 نشان داده شده‌اند. سایر اسیدهای آمینه موجود در زنجیر پلی‌پپتیدی تنها براساس موقعیت کربن α نشان داده شده‌اند، حروف M، V، و P اشاره به زنجیرهای جانبی متیل، وینیل، و پروپیونات هم دارند.

1. Proximal histidine 2. Distal hisitidine

جانبی غیرقطبی موجود در پاکت هِم می‌باشد (نیروهای آبگریز را ببینید، ص ۱۵۸). تعاملات دیگر در میوگلوبین بین گروه‌های پروپیونات دارای بار منفی هِم و زنجیرهای جانبی آرژنین و هیستیدین با بار مثبت رخ می‌دهد. در زنجیرهای هموگلوبین، یک تفاوت در توالی اسید آمینه‌ای این ناحیه جایگاه اتصالی هِم منجر به تثبیت پروپیونات‌های پورفیرینی از طریق تعامل با یک ایمیدازول هیستیدینی و با ملکول‌های آب حلال به سمت سطح خارجی ملکول می‌شود.

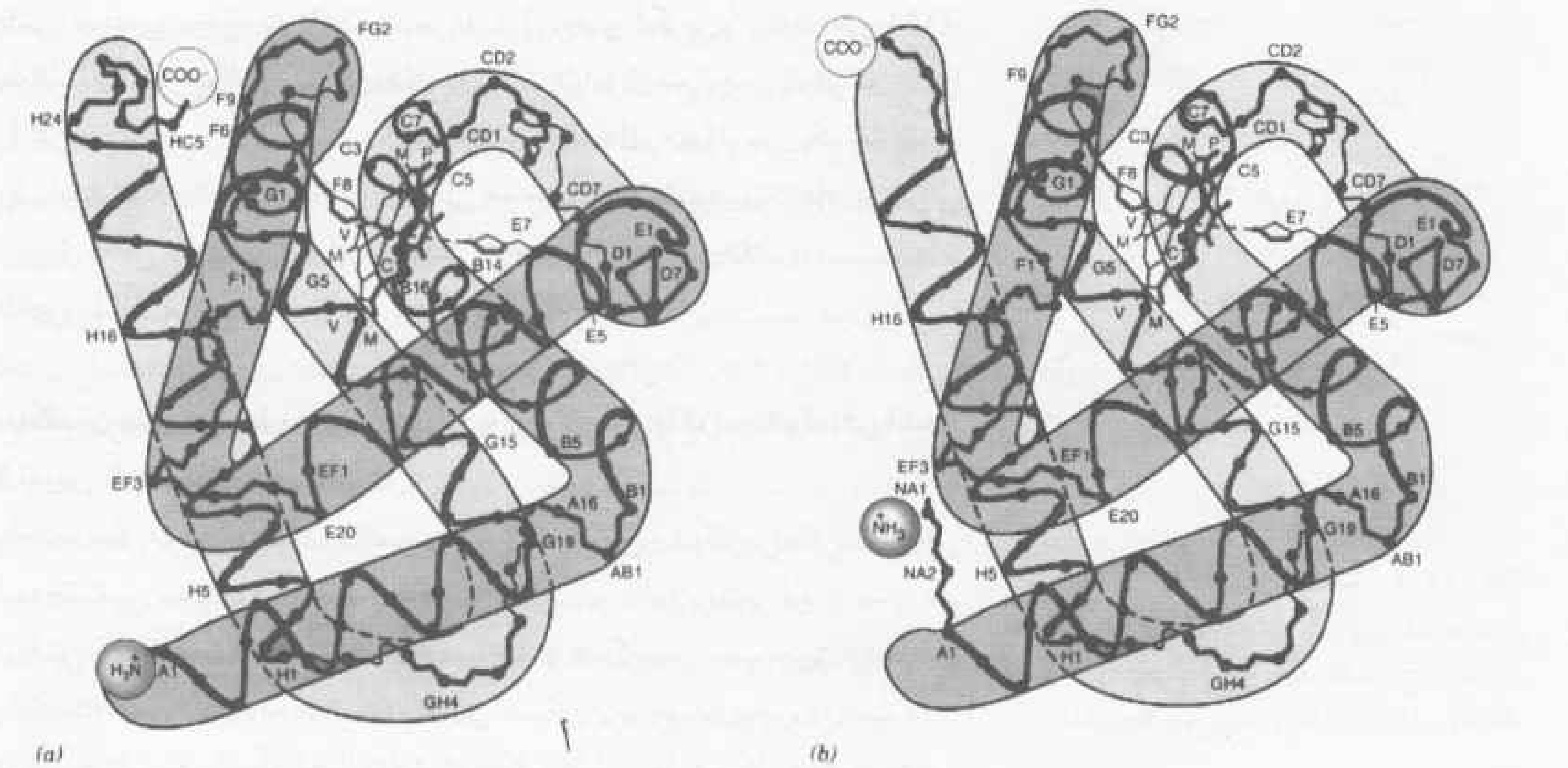
ساختمان‌های مربوط به هموگلوبین و میوگلوبین با کریستالوگرافی اشعه X تعیین شده‌اند

ساختمان‌های مربوط به اشکال داکسی و اکسی هموگلوبین و میوگلوبین با کریستالوگرافی اشعه-X تعیین شده‌اند. در حقیقت، میوگلوبین اسپرم وال[1] اولین پروتئینی بود که ساختمان آن با این تکنیک تعیین شد و به دنبال آن ساختمان هموگلوبین اسب تعیین گردید. این ساختمان‌ها نشان دادند که هر ملکول گلوبین متشکل از نواحی مارپیچی α است که از طریق پیچ‌هایی به یکدیگر اتصال دارند که امکان تاشدن آنها به شکل کروی مشخص فولد گلوبینی[2] را فراهم می‌سازد (شکل ۲۲-۹ و شکل ۳۷-۳).

ساختمان‌های اول، دوم و سوم زنجیرهای میوگلوبین و هموگلوبین

مقایسه توالی‌های اسید آمینه‌ای میوگلوبین از گونه‌های حیوانی متعدد نشان داده است که تمامی زنجیرهای میوگلوبین ۱۵۳ اسید آمینه دارند که ۸۳ مورد آنها ثابت هستند. تنها ۱۵ ریشه ثابت با ریشه‌های ثابت زنجیرهای گلوبینی موجود در هموگلوبین‌های پستانداران یکسان می‌باشند. در حالی‌که تنوع تعجب‌برانگیزی در این توالی‌ها وجود دارد، ساختمان‌های دوم و سوم تقریباً یکسان هستند (شکل ۲۳-۹). به‌علاوه، تمامی زنجیرهای گلوبینی به‌شکل برگشت‌پذیر به اکسیژن اتصال می‌یابند. هر چند، وقتی توالی‌های میوگلوبین با توالی‌های موجود در زنجیرهای گلوبینی موجود در هموگلوبین مقایسه می‌شوند، تغییرات اکثراً حفظ‌شده هستند که در آنها خصوصیات فیزیکی ریشه‌ها حفظ شده است (جدول ۹-۹). تغییرات ایجادشده در توالی‌های مربوط به میوگلوبین و هموگلوبین به‌طور نسبی براساس ساختمان منومری میوگلوبین شرح داده می‌شود؛ به‌طوری که بسیاری از موقعیت‌های سطحی آن با آب در تعامل بوده و مانع پیوستن ملکول دیگر میوگلوبین می‌شود. برعکس، ریشه‌های سطحی مربوط به زیرواحدهای مجزای موجود در هموگلوبین، پیوندهای هیدروژنی و تماس‌های غیرقطبی را با سایر زیرواحدها در ساختمان چهارم به‌وجود می‌آورند. هیستیدین‌های نزدیک و دور به آهن هِم، و همین‌طور پاکت‌های هِمی آبگریز که برای تماس‌های غیرقطبی با هِم ضروری هستند، در تمامی زنجیرهای گلوبینی حفظ‌شده هستند.

1. Sperm whale 2. Globin fold



شکل ۲۳-۹ مقایسه کونفورماسیون (a) میوگلوبین و (b) زنجیر β از HbA_1. به استثناء دو انتهای آمینو و کربوکسیل، ساختمان این دو بسیار مشابه می‌باشد.

هر نوع تفاوت قابل توجه در خصوصیات فیزیولوژیکی بین زنجیرهای α، β، γ و δ هموگلوبین‌ها و زنجیر میوگلوبین ناشی از تغییرات نسبتاً کوچک اختصاصی در ساختمان آنها می‌باشد. شباهت در ساختمان سوم نشان می‌دهد که ساختمان تاشده یکسانی در یک پلی‌پپتید را می‌توان با توالی‌های مختلف به دست آورد.

حدود ۷۰٪ ریشه‌ها در مارپیچ‌های α فولد گلوبینی شرکت نموده و تولید هفت مارپیچ α در زنجیر α و هشت مارپیچ α در زنجیر β می‌کند. این هشت ناحیه مارپیچی اخیر معمولاً با شروع از انتهای آمینو به صورت A تا H نامگذاری می‌شوند. نواحی بین مارپیچی به ترتیب به صورت AB، BC، CD، ...، GH مشخص می‌شوند. ناحیه غیر-مارپیچی موجود در انتهای آمینو را با NA و ناحیه مربوطه در انتهای کربوکسیل را با HC نمایش می‌دهند (شکل ۲۲-۹). شماره‌گذاری ریشه‌های اسید آمینه به‌طور متوالی از ۱ در هر مارپیچ و نواحی بین‌مارپیچی نامگذاری‌شده صورت می‌گیرد. این سیستم نامگذاری این امکان را فراهم می‌سازد تا بتوان نواحی و ریشه‌های خاصی را در هموگلوبین و میوگلوبین مورد بررسی قرار داد که نقش‌های ساختمانی و عملکردی مشابهی دارند.

اتصال O_2 به میوگلوبین با یک تعادل ساده مشخص می‌شود

اتصال اکسیژن به میوگلوبین با یک ثابت تعادل ساده مشخص می‌شود (معادلات ۱-۹ و ۲-۹). $[MbO_2]$ غلظت محلول اکسی‌میوگلوبین، $[Mb]$ غلظت داکسی‌میوگلوبین، و

جدول ۹-۹ • توالی‌های اسید آمینه‌ای مربوط به زنجیرهای هموگلوبینی و میوگلوبین[1]

		NA 1	2	3	A 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	A 16	AB 1	B 1	2	3	4	5	6
MYOGLOBIN		Val	...	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Trp	Gln	Leu	Val	Leu	His	Val	Trp	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Asp	Val	Ala	Gly	His	Gly
HEMOGLOBIN	Horse α	Val	...	Leu	Ser	Ala	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Ser	Lys	Val	Gly	Gly	His	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly
	β	Val	Gln	Leu	Ser	Gly	Glu	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Trp	Asp	Lys	Val	Asn	...	...	Glu	Glu	Glu	Val	Gly
	Human α	Val	...	Leu	Ser	Pro	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Gly	Lys	Val	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Glu	Tyr	Gly
	β	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	...	...	Val	Asp	Glu	Val	Gly
	γ	Gly	His	Phe	Thr	Glu	Glu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ilu	Thr	Ser	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	...	...	Val	Glu	Asp	Ala	Gly
	δ	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	...	...	Val	Asp	Ala	Val	Gly

		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	C1	2	3	4	5	6	7	CD1	2	3	4	5	6	7	8	D1
MYOGLOBIN		Gln	Asp	Ilu	Leu	Ilu	Arg	Leu	Phe	Lys	Ser	His	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Arg	Phe	Lys	His	Leu	Lys	Thr
HEMOGLOBIN	Horse α	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Gly	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	...	Asp	Leu	Ser	His
	β	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Gly
	Human α	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Ser	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	...	Asp	Leu	Ser	His
	β	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Thr
	γ	Gly	Glu	Thr	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asn	Leu	Ser	Ser
	δ	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Ser

		2	3	4	5	6	7	E 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	E 15	16	17	18	19	20
MYOGLOBIN		Glu	Ala	Glu	Met	Lys	Ala	Ser	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	His	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Ilu	Leu	Lys
HEMOGLOBIN	Horse α	...	...	...	...	...	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Gly
	β	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	His	Ser	Phe	Gly	Glu	Gly	Val	His
	Human α	...	...	...	...	...	Gly	Ser	Ala	Gln	Val	Lys	Gly	His	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Val	Ala
	β	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala
	γ	Ala	Der	Ala	Ilu	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Asp	Ala	Ilu	Lys
	δ	Pro	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	His	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Phe	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala

		EF1	2	3	4	5	6	7	8	F1	2	3	4	F5	6	7	8	9	FG1	2	3	4	5	G1	2	3	4
MYOGLOBIN		Lys	Lys	Gly	His	His	Glu	Ala	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Ala	Gln	Ser	His	Ala	Thr	Lys	His	Lys	Ilu	Pro	Ilu	Lys	Tyr
HEMOGLOBIN	Horse α	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	Ser	Asn	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Asn
	β	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn
	Human α	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp	Pro	Val	Asn
	β	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn
	γ	His	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Gln	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn
	δ	His	Leu	Asn	Asp	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ser	Gln	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp	Pro	Glu	Asn

		5	6	7	8	G 9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	GH 1	2	3	4	5	6	H 1	2	H 3	4	5
MYOGLOBIN		Leu	Glu	Phe	Ilu	Ser	Glu	Ala	Ilu	Ilu	His	Val	Leu	His	Ser	Arg	His	Pro	Gly	Asn	Phe	Gly	Ala	Asp	Ala	Gln	Gly
HEMOGLOBIN	Horse α	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala	Val	His	Leu	Pro	Asn	Asp	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	His	Ala
	β	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Ala	Leu	Val	Val	Ala	Arg	His	Phe	Gly	Lys	Asp	Phe	Thr	Pro	Glu	Leu	Gln	Ala
	Human α	Phe	Lys	Leu	Leu	Ser	His	Cys	Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Pro	Ala	Glu	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	His	Ala
	β	Phe	Srg	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Cys	Val	Leu	Ala	His	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Pro	Val	Gln	Ala
	γ	Phe	Lys	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Val	Leu	Ala	Ilu	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Glu	Val	Gln	Ala
	δ	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	Leu	Val	Cys	Val	Leu	Ala	Arg	Asn	Phe	Gly	Lys	Glu	Phe	Thr	Pro	Gln	Met	Gln	Ala

		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	H 21	22	23	2	HC 1	2	3	4	5
MYOGLOBIN		Ala	Met	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Leu	Phe	Arg	Lys	Asp	Ilu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Lys	Glu	Leu	Gly	Tyr	Gln	Gly
HEMOGLOBIN	Horse α	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg						
	β	Ser	Tyr	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His						
	Human α	Ser	Leu	Asp	Lys	Phe	Leu	Ala	Ser	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Thr	Ser	Lys	Tyr	Arg						
	β	Ala	Tyr	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His						
	γ	Ser	Trp	Gln	Lys	Met	Val	Thr	Gly	Val	Ala	Ser	Ala	Leu	Ser	Ser	Arg	Tyr	His						
	δ	Ala	Tyr	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Leu	Ala	His	Lys	Tyr	His						

[1] میوگلوبین از اسپرم وال. ریشه‌هایی که یکسان هستند در داخل کادر قرار داده شده‌اند. A، B، C، ... مارپیچ‌های مختلف ساختمان سوم را نشان می‌دهند (متن را ببینید).

$[O_2]$ غلظت اکسیژن است که همگی برحسب مول در لیتر می‌باشند. ثابت تعادل، K_{eq}، واحد مول در لیتر دارد. میزان K_{eq} وابسته به pH، قدرت یونی، و درجه حرارت است.

$$Mb + O_2 \xrightleftharpoons{K_{eq}} MbO_2 \qquad (۹-۱)$$

$$K_{eq} = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]} \qquad (۹-۲)$$

از آنجایی که اکسیژن یک گاز است، بیان غلظت آن به صورت فشار اکسیژن برحسب torr (یک torr برای فشار mm Hg ۱ در صفر درجه سانتیگراد و گراویته استاندارد) مناسب می‌باشد. در معادله ۳-۹ این تبدیل واحدها صورت گرفته است که با تغییر در سمبل‌ها نشان داده شده است : P_{50}، ثابت تعادل، و pO_2، غلظت اکسیژن، بیان برحسب torr.

$$P_{50} = \frac{[\mathrm{Mb}]\cdot pO_2}{[\mathrm{MbO_2}]} \qquad (۹-۳)$$

در یک منحنی اتصالی یا اشباع اکسیژنی، کسر جایگاه‌های اتصال به اکسیژنی که حاوی اکسیژن هستند (Y، معادله ۴-۹) بر روی محور عمودی در برابر pO_2 (غلظت اکسیژن) بر روی محور افقی رسم می‌شود. میزان Y برای میوگلوبین براساس معادله ۵-۹ تعریف می‌شود. با جایگزینی میزان $[\mathrm{MbO_2}]$ حاصل از معادله ۳-۹ در معادله ۵-۹ و تقسیم معادله بر $[\mathrm{Mb}]$، معادله ۶-۹ حاصل می‌شود که وابستگی Y به میزان ثابت تعادل، P_{50}، و به pO_2 را نشان می‌دهد. براساس معادلات ۳-۹ و ۶-۹، میزان P_{50} برابر pO_2 در زمان $Y = ۰/۵$ (۵۰٪ جایگاه‌های قابل‌دسترسی اشغال شده‌اند) و در نتیجه نمایش ثابت تعادل به صورت P_{50} می‌باشد.

$$Y = \frac{\text{تعداد جایگاه‌های اتصالی اشغال‌شده}}{\text{تعداد کل جایگاه‌های اتصالی در محلول}} \qquad (۹-۴)$$

$$Y = \frac{[\mathrm{MbO_2}]}{[\mathrm{Mb}] + [\mathrm{MbO_2}]} \qquad (۹-۵)$$

$$Y = \frac{pO_2}{P_{50} + pO_2} \qquad (۹-۶)$$

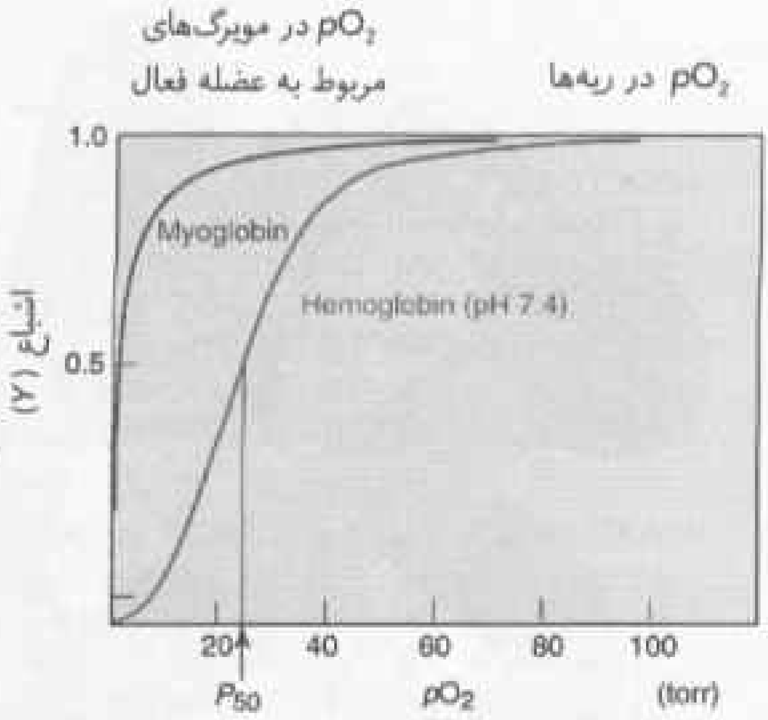
نتیجه نمودار معادله ۶-۹ برای Y در برابر pO_2 یک منحنی اشباع اکسیژنی برای میوگلوبین است که شکل سهمی راست‌گوشه[1] را دارد (شکل ۲۴-۹).

با دستکاری جبری ساده معادله ۶-۹ معادله ۷-۹ حاصل می‌شود. با گرفتن لگاریتم هر دو سمت معادله ۷-۹، معادله ۸-۹، **معادله هیل**[2] به دست می‌آید. نمودار $\log[Y/(1-Y)]$ در برابر $\log pO_2$، براساس معادله ۸-۹، خلط مستقیمی را نشان می‌دهد که شیب آن برای میوگلوبین برابر ۱ می‌باشد (شکل ۲۵-۹). این نمودار هیل است و شیب (n_{H}) ضریب هیل می‌باشد (معادله ۹-۹).

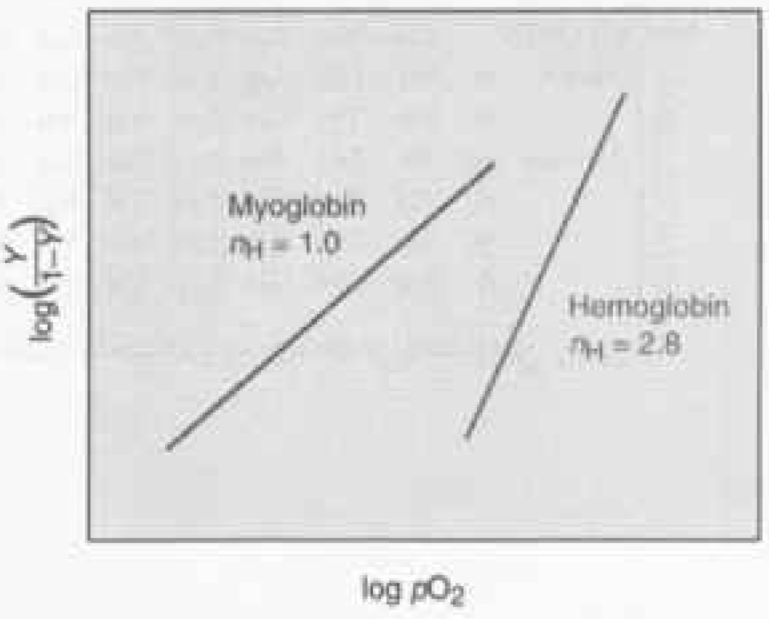
$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{pO_2}{P_{50}} \qquad (۹-۷)$$

$$\log\frac{Y}{1-Y} = \log pO_2 - \log P_{50} \qquad (۹-۸)$$

$$\log\frac{Y}{1-Y} = n_{\mathrm{H}} \log pO_2 - \mathrm{constant} \qquad (۹-۹)$$



شکل ۲۴-۹ منحنی‌های اتصال به اکسیژن میوگلوبین و هموگلوبین. این نمودارها در این سیستم مختصات، منحنی میوگلوبین را نزدیک به میزان pO_2 صفر قرار می‌دهد. در صورتی که محور pO_2 در اطراف ناحیه P_{50} میوگلوبین توسعه داده شود، تغییر در Y حساسیت پایین‌تری را در میوگلوبین نسبت به تغییر چندبرابر در غلظت اکسیژن در مقایسه با هموگلوبین نشان خواهد داد (شاخص همکاری یا تعاونی، جدول ۱۰-۹، را ببینید). این شاخص، براساس ضرایب مشاهده‌شده هیل، نشان می‌دهد که تغییرات میوگلوبینی از $Y = ۰/۱$ به $Y = ۰/۹$ همراه با یک تغییر ۸۱ برابر در غلظت اکسیژن است، در حالی که هموگلوبین در این غلظت اکسیژن تنها ۴/۸ برابر تغییر می‌کند.



شکل ۲۵-۹ نمودارهای هیل برای میوگلوبین و هموگلوبین A_1.

1. Rectangular hyperbola 2. Hill equation

اتصال O_2 به هموگلوبین مستلزم همکاری بین زیرواحدها است

اتصال چهار O_2 به هموگلوبین به صورت **همکاری مثبت**[1] نمایان می‌شود، زیرا اتصال اولین O_2 سبب تسهیل در اتصال O_2 به زیرواحدهای دیگر می‌شود. برعکس، جدایی اولین O_2 از $Hb(O_2)_4$، جدایی O_2 از سایر زیرواحدها را تسهیل می‌کند.

به دلیل این همکاری، منحنی اشباع اکسیژنی هموگلوبین متفاوت از منحنی مربوط به میوگلوبین است. نمودار Y در برابر pO_2 برای هموگلوبین، سیگموئیدی است که همکاری در اتصال اکسیژنی را نشان می‌دهد (شکل ۲۴-۹). نمودار معادله هیل (معادله ۹-۹) شیب (n_H) برابر ۲٫۸ را نشان می‌دهد (شکل ۲۵-۹). مقادیر $n_H=$ ۱٫۰ هیچ نوع همکاری را در اتصال سوبسترا به پروتئین‌های دارای چند جایگاه فعال نشان نمی‌دهد. مقادیر $n_H >$ ۱٫۰ نشان‌دهنده وجود همکاری مثبت است که در آن مقادیر بالاتر با همکاری مثبت بیشتر در اتصال ارتباط دارند. مقادیر n_H بیش از صفر و کمتر از یک، همکاری منفی را نشان می‌دهند که هر چه به صفر نزدیک‌تر باشد، همکاری منفی بیشتر خواهد بود.

همان‌طورکه در جدول ۱۰-۹ نشان داده شده است، معنی ضریب هیل در اتصال تعاونی O_2 به‌طور کمّی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. یک **شاخص همکاری**[2]، Rx، محاسبه می‌شود که نشان می‌دهد برای تغییر Y از یک میزان $Y=$ ۰٫۱ (اشغال ۱۰٪ جایگاه‌ها) به میزان $Y=$ ۰٫۹ (اشغال ۹۰٪ جایگاه‌ها) برای مقادیری از ضریب هیل که به‌طریق تجربی تعیین شداند، نیاز به تغییر چند برابر در pO_2 می‌باشد. برای میوگلوبین $n_H=$ ۱ و برای تغییر ۰٫۱ $= Y$ به ۰٫۹ $= Y$ نیاز به یک تغییر ۸۱ برابر در غلظت اکسیژن است. در مورد هموگلوبین، با $n_H=$ ۲٫۸، برای این میزان تغییر Y تنها نیاز به یک تغییر ۴/۸ برابر در غلظت اکسیژن می‌باشد.

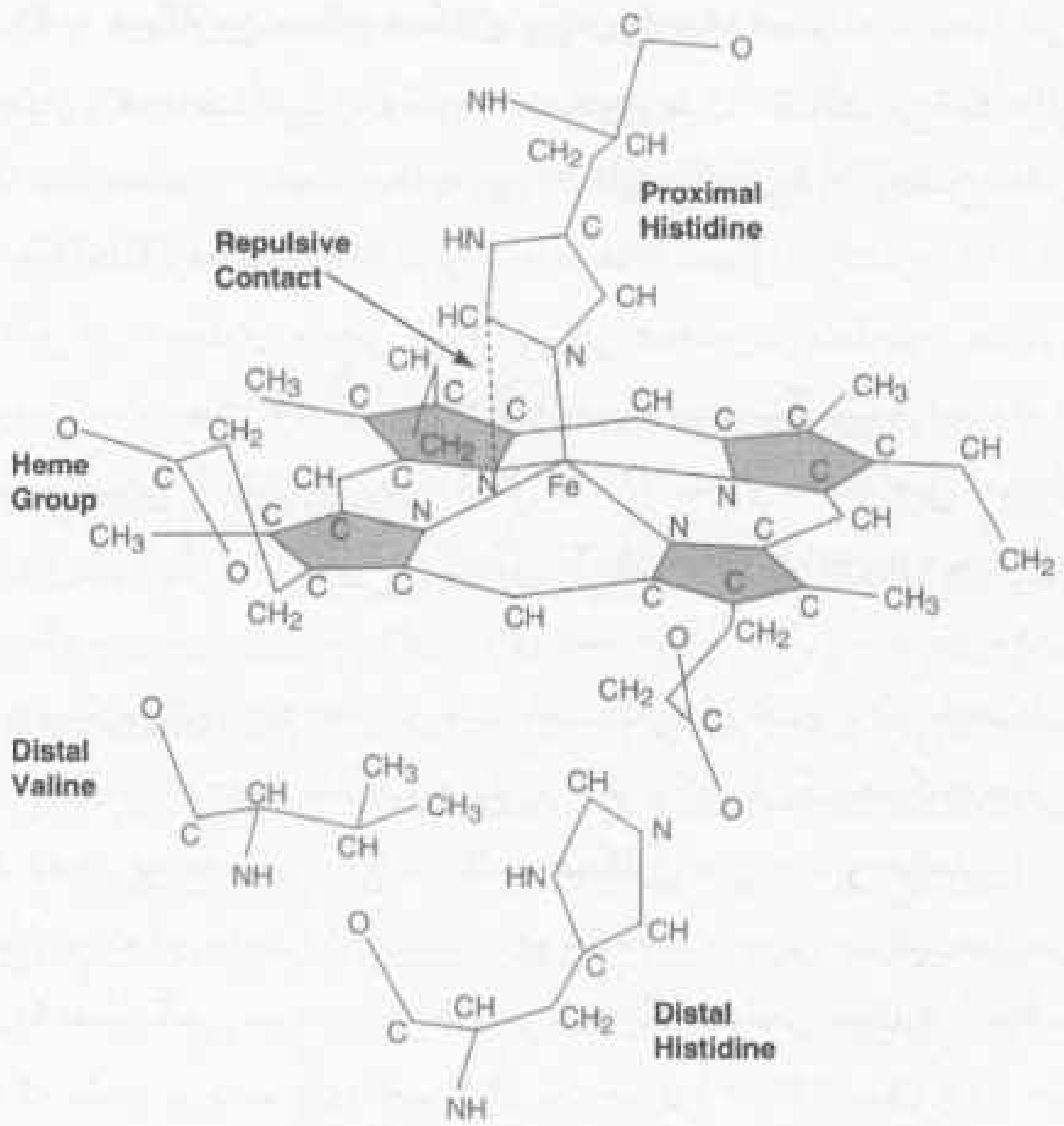
جدول ۱۰-۹ • ارتباط بین ضریب هیل (n_H) و شاخص همکاری (R_x)

مشاهده	R_x	n_H
همکاری سوبسترای منفی	۶۵۶۰	۰٫۵
	۱۵۲۰	۰٫۶
	۵۳۳	۰٫۷
	۲۴۳	۰٫۸
	۱۳۲	۰٫۹
بدون همکاری	۸۱٫۰	۱٫۰
همکاری سوبسترای مثبت	۱۸٫۷	۱٫۵
	۹٫۰	۲٫۰
	۴٫۸	۲٫۸
	۳٫۵	۳٫۵
	۲٫۱	۶٫۰
	۱٫۶	۱۰٫۰
	۱٫۳	۲۰٫۰

مکانیسم ملکولی همکاری در اتصال O_2

داده‌های مربوط به انکسار اشعه-X داکسی‌هموگلوبین نشان می‌دهند که اتم‌های فرو حدود ۰٫۶Å-۰٫۴ در خارج صفحه پورفیرین‌های خود قرار دارند. کونفیگوراسیون الکترونیک اتم فرو پنج-کوئوردینانتی در داکسی‌هموگلوبین یک شعاع قدری بزرگتر از فاصله مرکز پورفیرین با هر کدام از اتم‌های نیتروژن پیرول دارد. لذا آهن تنها با قدری تغییر در کونفورماسیون پورفیرین می‌تواند در مرکز پورفیرین قرار گیرد. احتمالا این موضوع اهمیت بیشتری دارد که اگر اتم آهن در صفحه پورفیرینی قرار گیرد، ایمیدازول His F8 نزدیک به شکل نامساعدی با پورفیرین تعامل خواهد نمود. این تعامل فضایی نامساعد، تا حدودی، به دلیل فشارهای کونفورماسیونی موجود بر His F8 و پورفیرین در کونفورماسیون داکسی‌هموگلوبین می‌باشد که سبب می‌شود نزدیکی His F8 به پورفیرین از مسیر خاصی صورت گیرد (شکل ۲۶-۹). این فشارها در اکسی‌هموگلوبین کمتر می‌شوند. وقتی اتم آهن در خارج صفحه پورفیرین

1. Positive cooperativity   2. Cooperativity index



شکل ۲۶-۹ ممانعت فضایی بین هیستیدین نزدیک و پورفیرین در داکسی‌هموگلوبین.

قرار داشته باشد، این کونفورماسیون تحت فشار قرار نداشته و از نظر انرژتیک برای اتم فرد پنج-کوئوردیناتی مساعد است. هر چند وقتی O_2 ششمین پیوند را با آهن تشکیل می‌دهد، این کونفورماسیون تحت فشار قرار می‌گیرد. یک کونفورماسیون برای آهن متصل به O_2 که از نظر انرژی مساعدتر است، کونفورماسیونی است که در آن اتم آهن در داخل صفحه پورفیرین قرار دارد.

انرژی اتصالی O_2 بر دافعه بین His F8 و پورفیرین غلبه می‌کند و اتم فرو به داخل صفحه پورفیرین حرکت می‌کند. این پایدارترین موقعیت برای اکسی-هِم از نظر ترمودینامیکی است که در آن اتم آهن شش پیوند با یک لیگاند محوری یک سمت صفحه پورفیرین دارد، و دافعه فضایی یک لیگاند محوری با دافعه لیگاند محوری دوم در سمت مخالف در هنگام قرارگیری اتم فرو در مرکز، متعادل می‌گردد. به علاوه، شعاع اتم آهن دارای شش پیوند، آنقدر کاهش می‌یابد که بخوبی در مرکز پورفیرین بدون تغییر کونفورماسیون پورفیرین قرار می‌گیرد.

از آنجایی‌که دافعه فضایی بین پورفیرین و His F8 در کونفورماسیون داکسی می‌بایست بر اتصال O_2 غلبه کند، اتصال اولین O_2 با یک ثابت تمایل نسبتاً پایین مشخص می‌شود. هر چند، با اتصال اولین O_2 به اولین هِم، حرکت آهن به داخل مرکز پورفیرین سبب آغاز یک تغییر کونفورماسیونی در سایر زیرواحدهای ملکول هموگلوبین می‌شود. این تغییر منجر به افزایش تمایل O_2 به سایر جایگاه‌های هِم خالی می‌گردد.

تغییر کونفورماسیونی مستلزم حوادث متوالی متصل به یکدیگر زیر می‌باشد: (۱) با اتصال O_2، Fe^{2+} به داخل صفحه پورفیرین کشانده می‌شود. (۲) حرکت Fe^{2+} سبب حرکت HisF8 نزدیک به سمت پورفیرین می‌شود. (۳) در نتیجه، موقعیت مارپیچ F دارای اتصال کووالان که HisF8 قسمتی از آن است، تغییر می‌کند. (۴) موقعیت گوشه FG [1] زیر واحد تغییر می‌کند؛ این تغییر سبب ناپایداری تعامل غیرکووالان گوشه FG با مارپیچ C زیرواحد مجاور در فصل مشترک زیرواحدی $\alpha_1\beta_2$ یا $\alpha_2\beta_1$ می‌شود (اشکال ۲۷-۹ و ۲۸-۹). (۵) ساختمانی گلوبینی مجاور به کونفورماسیونی تغییر می‌کند که امکان اتصال با تمایل بالای O_2 به هِم آن را فراهم می‌سازد.

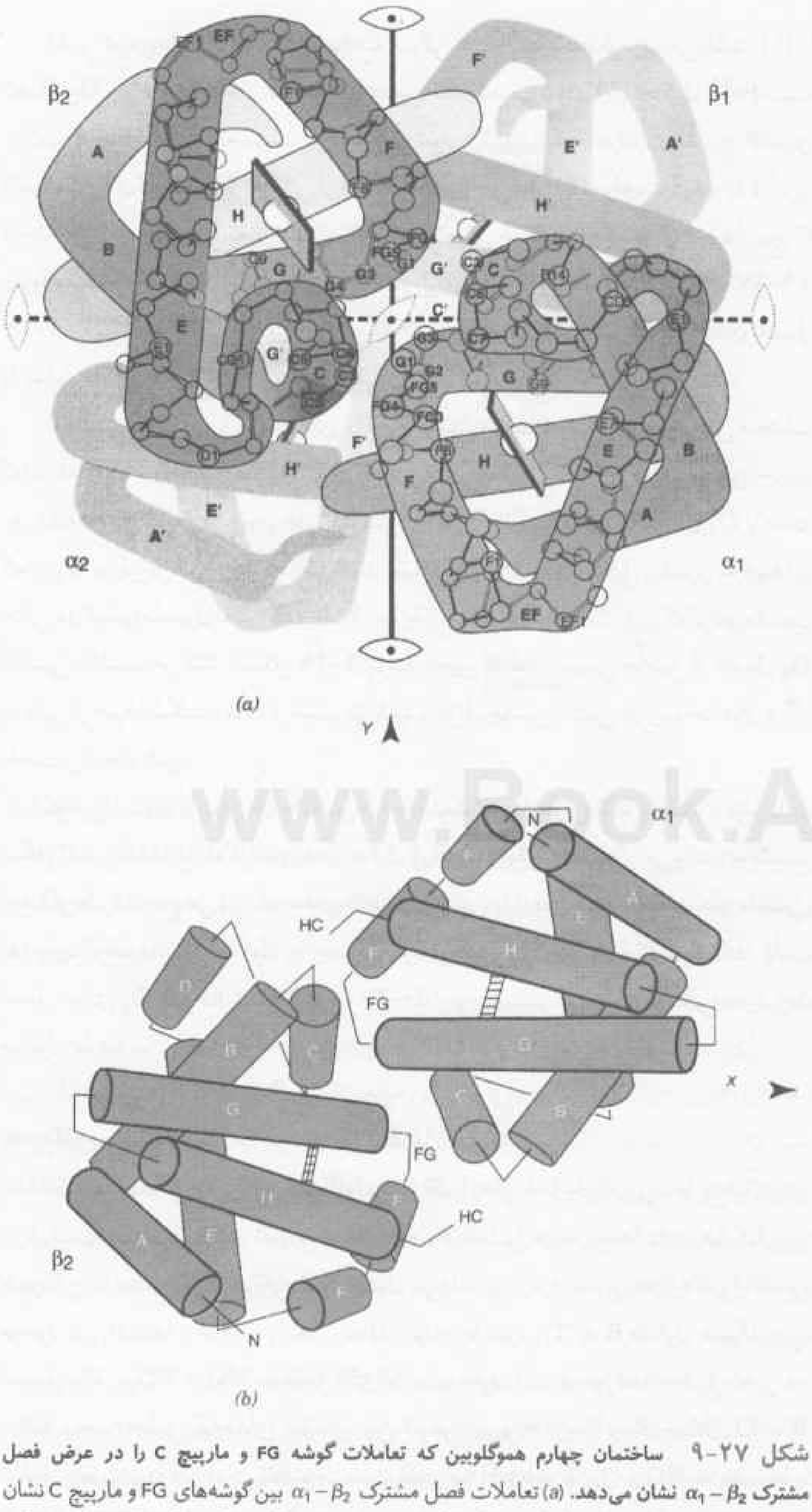
لذا تماس‌های بین زیرواحدهای FG به C همانند یک سوییچ بین دو آرایش مختلف گوشه FG یک زیرواحد و مارپیچ C زیرواحد مجاور عمل می‌کند. این کونفورماسیون جدید به ریشه‌های HisF8 در زنجیرهای گلوبینی داکسی اجازه می‌دهد تا با اتصال O_2 با دافعه کمتری به پورفیرین‌های خود نزدیک شوند (شکل ۲۸-۹). O_2 با تمایل بیشتری به هِم‌های خالی در کونفورماسیون تغییریافته اتصال می‌یابد. به‌علاوه، تعاملات یونی که کونفورماسیون داکسی را تثبیت می‌کنند (شکل ۲۹-۹) توسط تغییر کونفورماسیونی حاصل از اتصال O_2 به یکی از هِم‌ها شکسته شده و سبب می‌شود تا کونفورماسیون اکسی در زیرواحدهای دیگر راحت‌تر ایجاد شود.

کونفورماسیون داکسی هموگلوبین در **حالت کونفورماسیونی T** یا سخت [2] قرار دارد. شکل اکسی با تمایل بالاتر به O_2 در حالت **کونفورماسیونی R** یا شل [3] می‌باشد. مکانیسم آلوستریک تشریح می‌کند که چطور اتصال ابتدایی O_2 به یک زیرواحد هم ملکول تترامری، کونفورماسیون ملکول را از حالت کونفورماسیون T به سمت R می‌کشاند. ثابت تمایل برای O_2 در حالت R حدود ۳۰۰-۱۵۰ برابر بیشتر است که بستگی به شرایط محلول دارد.

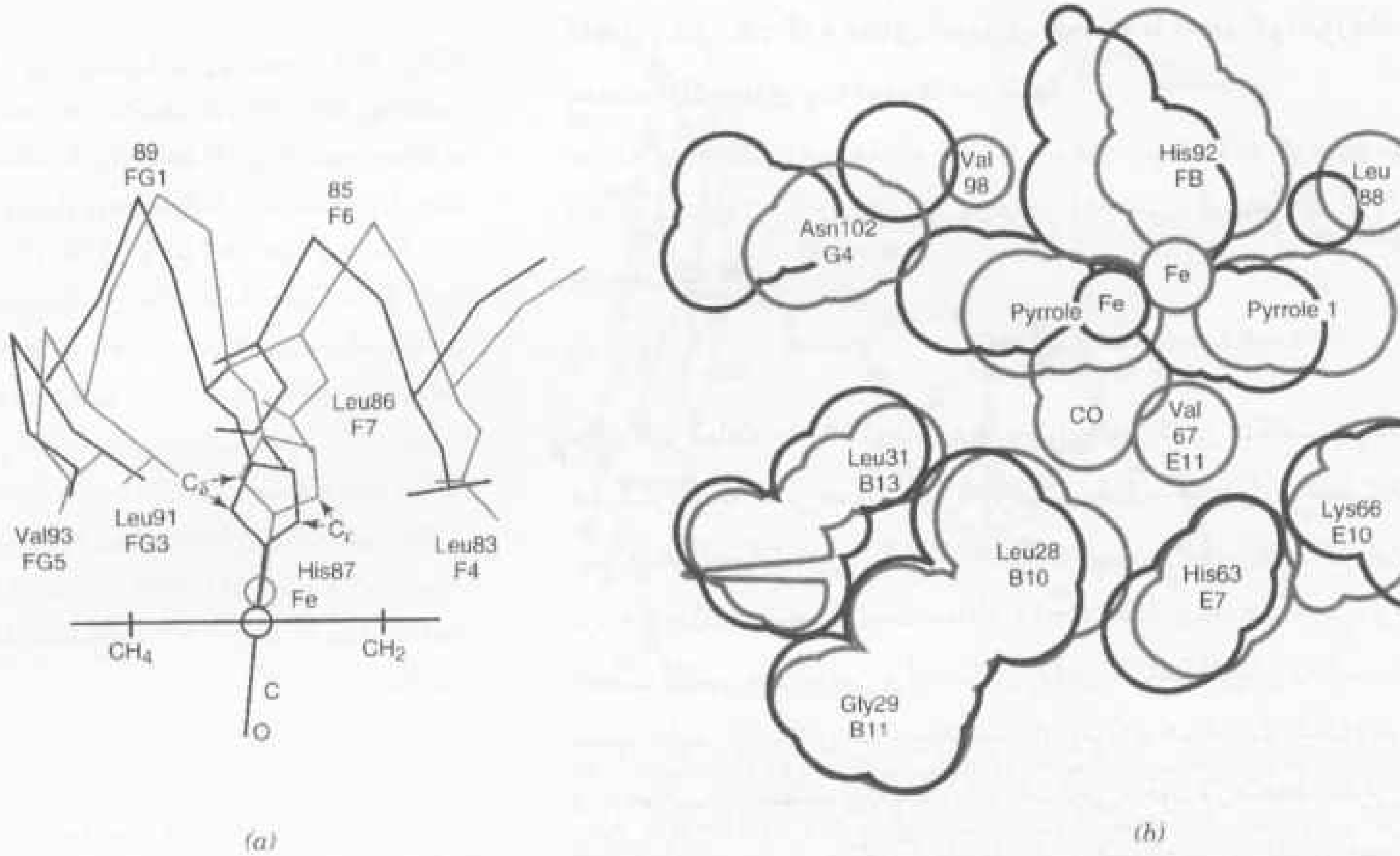
هموگلوبین انتقال CO_2 و NO را تسهیل می‌کند

بقاء سلول‌ها بستگی به توانایی هموگلوبین در گلبول‌های قرمز خون برای تحویل O_2 برای متابولیسم سلولی و برای تسهیل انتقال CO_2 از سلول‌ها به ریه‌ها دارد. هموگلوبین همچنین به متسع‌کننده عروقی NO اتصال می‌یابد و آن را به دیواره‌های عروق خونی موجود در بافت‌ها تحویل می‌دهد. تعادل کونفورماسیونی T به R ملکول هموگلوبین، تحویل O_2، CO_2 و NO به محل‌های مناسب خود را کنترل می‌کند. به‌دلیل تغییر در pKa زنجیر جانبی گروه‌های اسیدی بین کونفورماسیون‌های T و R، تعادل $T \rightleftarrows R$ توسط غلظت یون هیدروژن تنظیم می‌شود. تغییرات pH تحویل O_2 و NO به بافت‌ها را با انتقال CO_2 از بافت‌ها مرتبط می‌سازد.

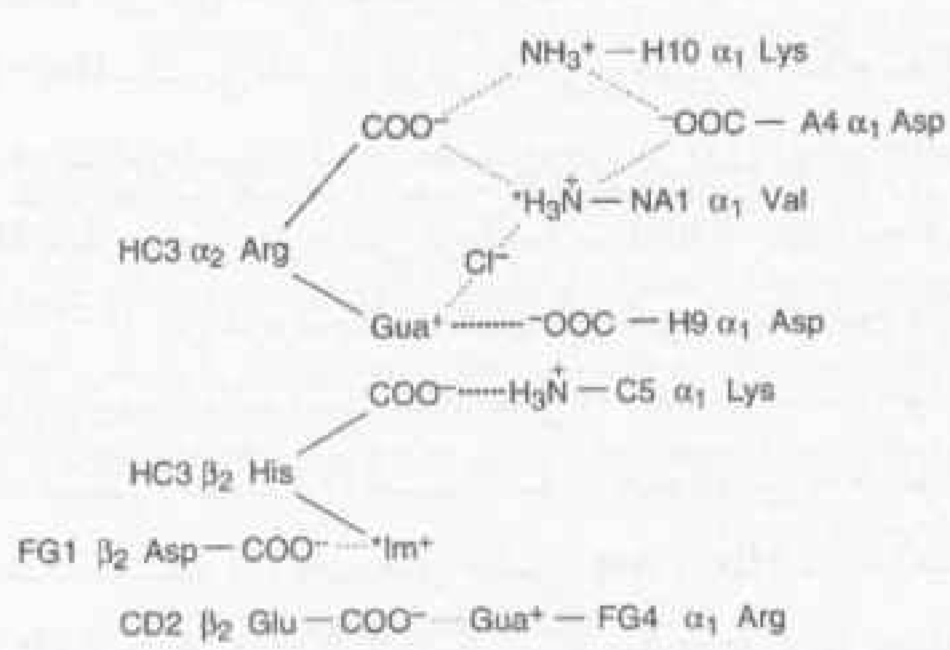
1. Corner FG 2. Tense 3. Relaxed



شکل ۹-۲۷ ساختمان چهارم هموگلوبین که تعاملات گوشه FG و مارپیچ C را در عرض فصل مشترک $\alpha_1-\beta_2$ نشان می‌دهد. (a) تعاملات فصل مشترک $\alpha_1-\beta_2$ بین گوشه‌های FG و مارپیچ C نشان داده شده‌اند. (b) نمایش استوانه‌ای زیرواحدهای α_1 و α_2 در هموگلوبین که تماس‌های فصل مشترک $\alpha_1-\beta_2$ بین گوشه FG و مارپیچ C را با نگاه از سمت مخالف صفحه xy نسبت به (a) نشان می‌دهد.



شکل ۲۸-۹ دیاگرام‌های میله‌ای و فضا-پرکن که به کمک گرافیک کامپیوتری رسم شده‌اند و حرکات ریشه‌ها در محیط هِم را در هنگام تبدیل داکسی‌هموگلوبین به اکسی‌هموگلوبین نشان می‌دهند. (a) خط سیاه حدود موقعیت زنجیر پلی‌پپتیدی و His F8 در منواکسید کربن هموگلوبین را نشان می‌دهد که مدلی برای اکسی‌هموگلوبین است. خط قرمز حدود موقعیت همان نواحی را برای داکسی‌هموگلوبین نشان می‌دهد. موقعیت اتم آهن با حلقه نشان داده شده است. حرکات مربوط به یک زیرواحد می‌باشند. (b) حرکات مشابه در موقعیت ریشه اسید آمینه‌ای در یک زیرواحد β با استفاده از دیاگرام فضا-پرکن نشان داده شده است. در کونفورماسیون داکسی، نشانگرهای ریشه به شکل متراکم در مرکز قرار می‌گیرند.



شکل ۲۹-۹ پل‌های نمکی بین زیرواحدها در داکسی‌هموگلوبین که در اکسی‌هموگلوبین شکسته می‌شوند. Im^+ برای ایمیدازول است، Gua^+ برای گوانیدینیوم می‌باشد، و ریشه‌های ستاره‌دار مسئول حدود ۶۰٪ اثر قلیایی بوهر هستند.

کاهش در pK_a گروه‌های اسیدی همراه با تغییر کونفورماسیون T به R سبب آزادسازی پروتون‌ها می‌شود

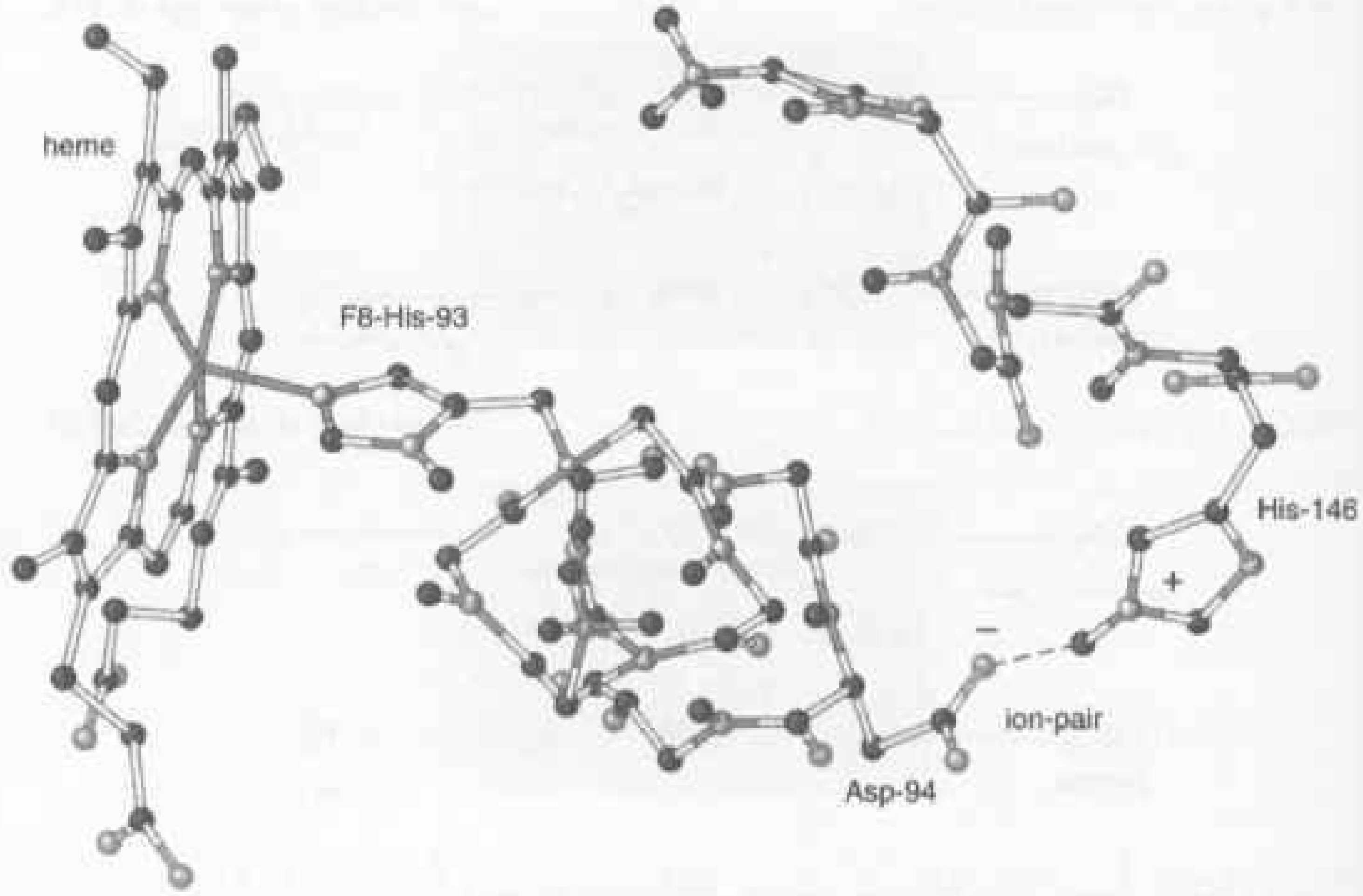
معادله ۱۰-۹ نشان می‌دهد که با تبدیل کونفورماسیون T به کونفورماسیون R، پروتون‌ها آزاد می‌شوند. این آزادسازی پروتون‌ها در pH خون، **اثر بوهر** قلیایی است و اهمیت فیزیولوژیک دارد.

$$\underset{T}{Hb} + 4O_2 \rightleftharpoons \underset{R}{Hb(O_2)_4} + nH^+ \qquad (۹-۱۰)$$

میزان n در معادله ۱۰-۹ (اکی‌والان‌های پروتونی آزادشده در هنگام تبدیل یک ملکول داکسی هموگلوبین به اکسی‌هموگلوبین)، برحسب شرایط محلول و غلظت یون کلر و ۳،۲-بیس‌فسفوگلیسرات، بین ۱٫۲ تا ۲٫۷ متفاوت است. براساس قانون اثر جرم، افزایش غلظت یون هیدروژن در سمت راست معادله ۱۰-۹، تعادل را به سمت چپ و به سمت افزایش غلظت داکسی‌هموگلوبین و آزادسازی O_2 می‌کشاند. افزایش فعالیت متابولیکی سلولی سبب افزایش آزادسازی هم اسیدکربنیک از CO_2 و هم اسیدلاکتیک (ص ۸۱۳) می‌شود، و به موجب آن غلظت یون هیدروژن (اسیدیتی) خون در محیط سلولی افزایش می‌یابد. افزایش اسیدیتی سبب تحریک تبدیل اکسی‌هموگلوبین به داکسی‌هموگلوبین و جدایی O_2 می‌شود که به سلول‌های متابولیزه‌کننده تحویل داده می‌شود. این یک قوس پس‌نوردی است که در آن محصولات متابولیکی اسیدی سلول سبب افزایش جدایی O_2 مورد نیاز برای تداوم متابولیسم سلولی می‌شود. افزایش غلظت یون هیدروژن سبب القاء تحویل O_2 از طریق اثر آن بر روی تعادل بین کونفورماسیون‌های R و T ملکول هموگلوبین می‌شود.

در هنگام تبدیل کونفورماسیون T به کونفورماسیون R، چرا پروتون‌ها از هموگلوبین جدا می‌شوند؟ پروتون‌ها زمانی جدا می‌شوند که زنجیرهای جانبی اسیدی هموگلوبین در کونفورماسیون R اسیدی‌تر از حالت موجود در کونفورماسیون T باشند. برای این منظور لازم است که pKa این گروه‌ها در کونفورماسیون R کمتر باشد.

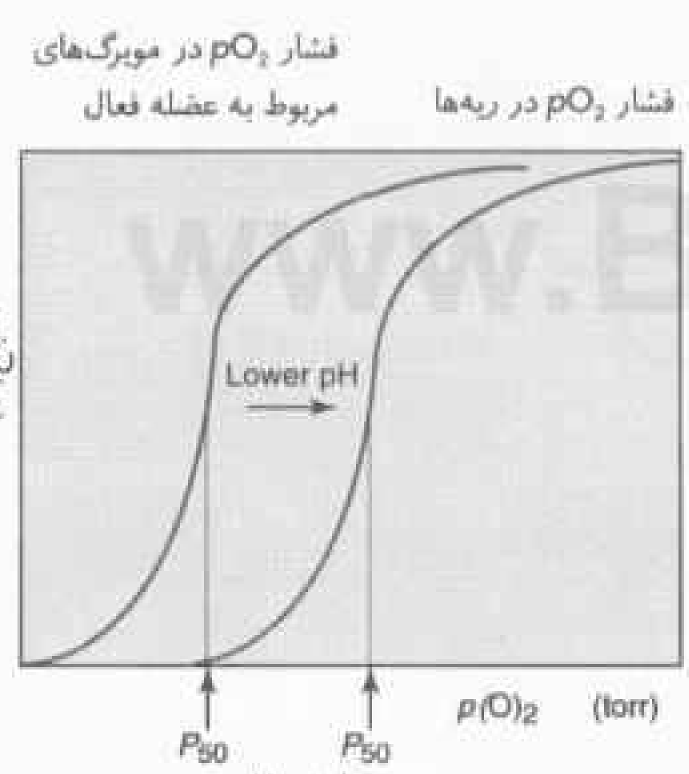
His – 146(β) بیشترین نقش را در این جدایی پروتونی در هنگام تبدیل کونفورماسیون T به R دارد. در کونفورماسیون T، بار مثبت موجود بر روی زنجیر جانبی ایمیدازولیوم His – 146(β) با بار منفی زنجیر جانبی کربوکسیلات Asp – 94(β) ایجاد یک جفت یونی می‌کند (شکل ۳۰-۹). این کربوکسیلات دارای بار منفی، ایمیدازولیوم دارای بار مثبت را تثبیت می‌کند. این ایمیدازولیوم تثبیت‌شده تمایل به حفظ بار مثبت خود دارد و pKa آن بزرگتر از حالت طبیعی (حدود ۷٫۷) است. با تبدیل هموگلوبین به کونفورماسیون R، این جفت یونی شکسته‌شده و زنجیرهای جانبی Asp و His در موقعیت‌های جدید کونفورماسیون R قرار می‌گیرند که در آن دیگر این گروه‌های دارای بار مخالف تعامل قوی ندارند، و با از بین رفتن تعامل بار مخالف سبب می‌شود تا ایمیدازولیوم His – 146(β) به یک pKa طبیعی‌تر حدود ۷٫۳ برگردد. تغییر در pKa مربوط به His – 146(β) به یک



شکل ۳۰-۹ جفت یونی بین گروه‌های زنجیر جانبی ایمیدازولیوم βHis – 146 و کربوکسیلات βAsp – 94 در کونفورماسیون داکسی (T) هموگلوبین. یک ساختمان نسبی از زیرواحد β که اسکلت زنجیر پلی‌پپتیدی برای اسیدهای آمینه ۸۷ تا ۹۵ و ۱۴۲ تا ۱۴۶ این زنجیر β را در کونفورماسیون داکسی نشان می‌دهد. تنها زنجیرهای جانبی Asp-94، His-146، و F8 His92 متصل به هم زیرواحد β نشان داده شده‌اند. اتم‌های اکسیژن با رنگ قرمز، اتم‌های نیتروژن با رنگ آبی، و اتم‌های کربن و هیدروژن به رنگ سیاه نشان داده شده‌اند. پیوند هیدروژنی (خط‌چین) بین N-H ایمیدازولیوم با بار مثبت از βHis–146 و اکسیژن کربوکسیلات دارای بار منفی از βAsp – 94 نشان داده شده است.

میزان اسیدی‌تر با تبدیل به کونفورماسیون R منجر به جدایی پروتون‌ها در pH خون (۷/۴) می‌شود. حدود ۵۰٪ پروتون‌هایی که جدا می‌شوند از ایمیدازولیوم β – His – 146 می‌آیند. بقیه از گروه‌های اسیدی دیگری می‌آیند که به‌طور مشابه pKa خود را در هنگام تغییر کونفورماسیون از T به R، از میزان بالاتر به پایین‌تر تغییر می‌دهند.

شکل ۳۱-۹ نمودار اشباع کسری جایگاه‌های اتصالی O_2 در هموگلوبین را در مقابل غلظت O_2 برای هموگلوبین در مقادیر مختلف pH نشان می‌دهد. در pH اسیدی‌تر ($[H^+]$ بالاتر) هموگلوبین O_2 خود را راحت‌تر آزاد می‌کند (معادله ۱۰-۹) و منحنی به سمت راست تغییر محل می‌دهد. به همین دلیل، P_{50} در pH اسیدی‌تر، بیشتر می‌باشد. P_{50} بالاتر تمایل ضعیف‌تر O_2 را نشان می‌دهد، زیرا جایگاه‌های اتصال به اکسیژن در غلظت $P(O_2)$ بالاتر ۵۰٪ اشباع می‌شوند. در pH بالاتر، منحنی به سمت چپ جا به جا شده و میزان P_{50} کاهش می‌یابد که انعکاسی از تمایل بالاتر به O_2 می‌باشد.



شکل ۳۱-۹ تغییر در منحنی اشباع اکسیژن-هموگلوبین به میزان P_{50} بالاتر با کاهش pH (افزایش $[H^+]$).

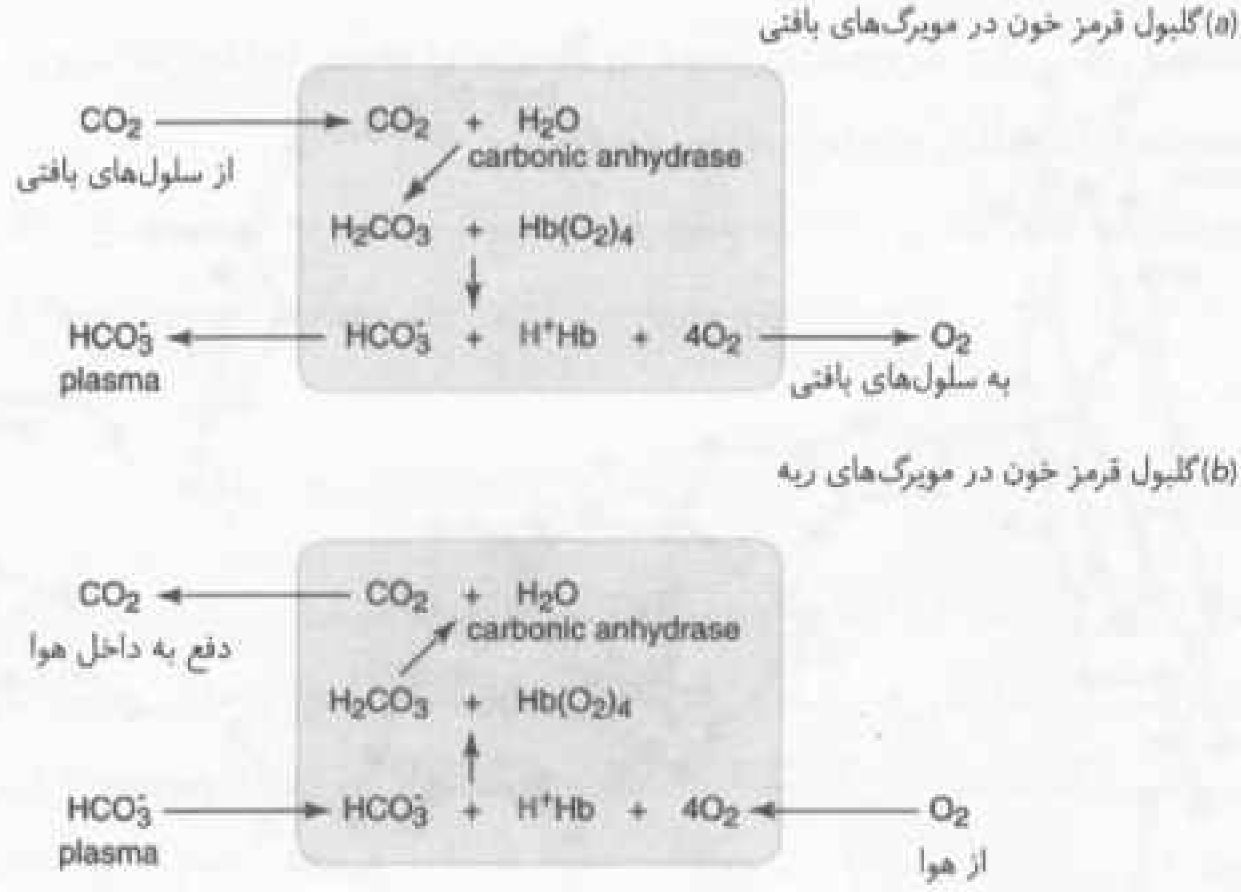
انتقال CO_2 و O_2 از طریق پروتون‌های اثر- بوهر با یکدیگر ارتباط دارند

سلول‌های متابولیزه‌کننده O_2 را مصرف و تولید CO_2 می‌کنند. CO_2 تولیدی توسط سلول‌ها به داخل خون اطراف انتشاریافته و وارد گلبول‌های قرمز خون می‌شود. در داخل این سلول‌ها، CO_2 سریعاً توسط آنزیم کربنیک انیدراز طی یک واکنش هیدراتاسیون به اسید کربونیک تبدیل می‌گردد (معادله ۱۱-۹).

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \quad (9-11)$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \quad (9-12)$$

در ادامه، اسید کربنیک به طور خود به‌خودی به HCO_3^- و یک H^+ تفکیک می‌شود



شکل ۳۲-۹ انتقال ایزوهیدریک CO_2 به‌صورت بیکربنات. (a) واکنش‌هایی که در سطح بافت‌ها در داخل گلبول‌های قرمز انجام می‌شوند. CO_2 از بافت‌ها به داخل گلبول‌های قرمز انتشار یافته و توسط کربنیک انیدراز به اسید کربونیک تبدیل می‌شود (معادله ۱۱-۹). اسید کربونیک به‌طور خودبه‌خودی به H^+ و HCO_3^- تفکیک می‌شود (معادله ۱۲-۹). پروتونی که از اسید کربونیک جدا می‌شود به داکسی Hb اتصال یافته و تعادل $Hb - O_2$ را از اکسی-هموگلوبین به‌سمت داکسی‌هموگلوبین می‌کشاند (معادله ۱۰-۹) که همراه با آزادسازی O_2 و انتشار آن به خارج گلبول قرمز و به بافت می‌باشد. HCO_3^- به خارج گلبول قرمز انتشار یافته و در پلاسما (خارج گلبول قرمز) به‌سمت ریه‌ها حمل می‌شود. (b) واکنش‌هایی که در سطح ریه‌ها در داخل گلبول‌های قرمز رخ می‌دهند. در ریه، فشار بالای O_2 سبب انجام واکنش‌ها در جهت مخالف می‌شود. واکنش‌ها عکس واکنش‌هایی هستند که در مویرگ‌ها رخ دادند.

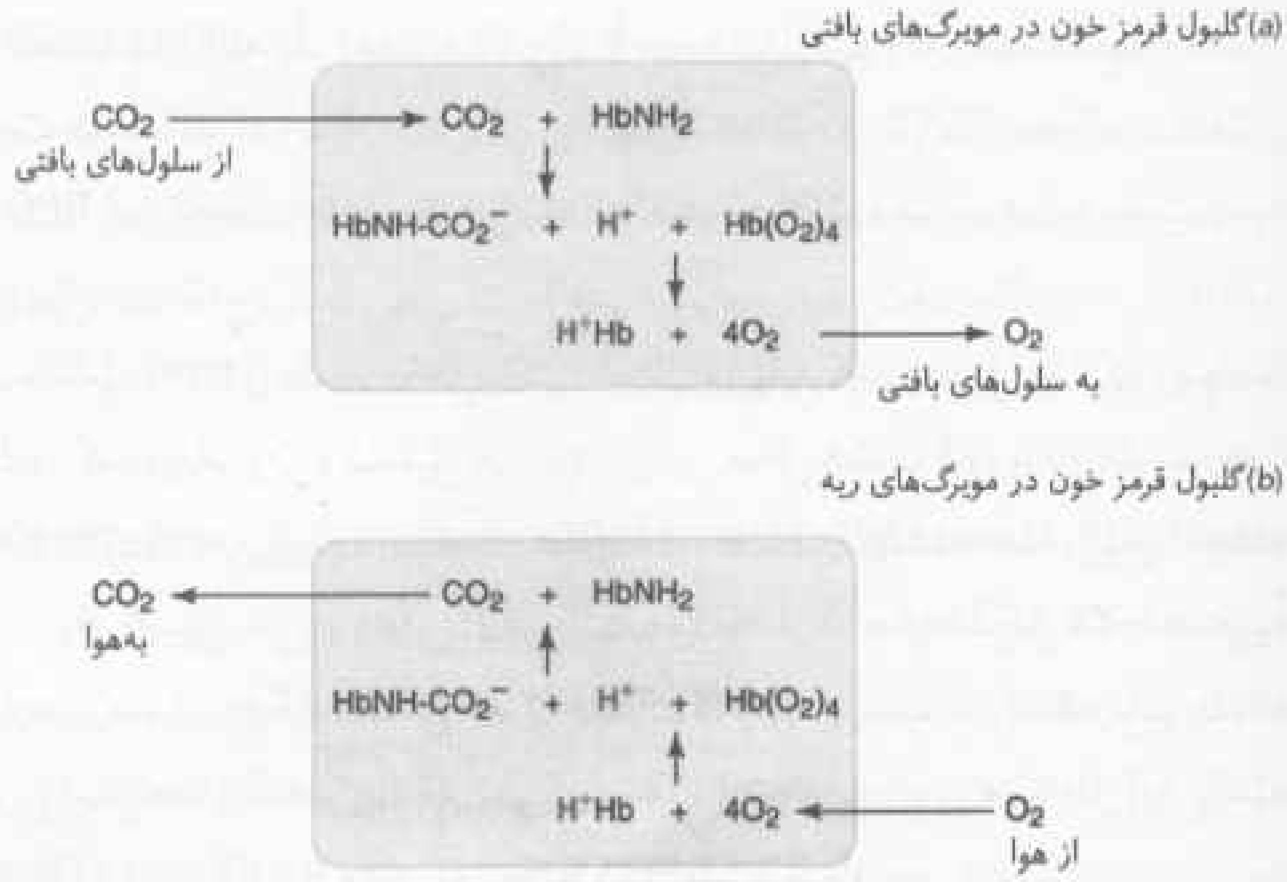
(معادله ۱۲-۹). HCO_3^- به خارج گلبول قرمز خون انتشار یافته و توسط پلاسما به ریه‌ها منتقل می‌گردد (شکل ۳۲-۹). این انتقال CO_2 از بافت‌ها به ریه‌ها در پلاسما به‌صورت بیکربنات (HCO_3^-) را **انتقال ایزوهیدریک**[1] گویند. حدود ۷۰٪ تا ۸۰٪ CO_2 تولیدی توسط بافت‌ها با این مکانیسم به ریه‌ها انتقال داده می‌شود.

یون‌های هیدروژنی که از اسید کربنیک جدا می‌شوند، براساس معادله ۱۰-۹ به هموگلوبین اتصال می‌یابند. لذا هموگلوبین از طریق اتصال به یون‌های هیدروژن حاصل از سلول‌های در حال متابولیسم، به عنوان یک بافر pH خون عمل کرده و بدین ترتیب اجازه نمی‌دهد که pH خون زیادی اسیدی شود. پروتون‌ها به زنجیرهای جانبی نظیر ایمیدازول $His-146(\beta)$ موجود در دو زنجیر β اتصال می‌یابند. داکسی H^+Hb در داخل گلبول‌های قرمز به ریه‌ها انتقال داده می‌شود.

در ریه‌ها همان واکنش‌های بافتی به‌دلیل غلظت بالای O_2 در ریه‌ها، در جهت عکس انجام می‌شوند. غلظت بالای pO_2 کونفورماسیون $H^+Hb(T)$ را به $Hb(O_2)_4(R)$ تبدیل می‌کند، پروتون‌ها جدا شده (معادله ۱۰-۹)، و در ترکیب با ملکول‌های HCO_3^- انتشار یافته از پلاسما به داخل گلبول‌های قرمز خون، تولید اسید کربنیک (H_2CO_3، عکس واکنش معادله ۱۲-۹) می‌کنند. کربنیک انیدراز گلبول‌های قرمز خون سبب تبدیل H_2CO_3 به CO_2 و H_2O می‌شود (عکس معادله ۱۱-۹). این CO_2 به داخل آلوئول‌های ریوی انتشار یافته و وارد هوای بازدمی می‌شود (شکل ۳۲-۹).

مکانیسم دوم انتقال CO_2 که مسئول ۱۵٪ تا ۲۰٪ CO_2 انتقالی از بافت‌ها به ریه‌ها است، از طریق **کربامینو-هموگلوبین** می‌باشد که توسط واکنش غیرآنزیمی CO_2 با گروه‌های

1. Isohydric transport



شکل ۳۳-۹ انتقال CO_2 به شکل کربامینوهموگلوبین. (a) واکنش‌هایی که در داخل گلبول‌های قرمز در سطح بافت‌ها انجام می‌شوند. CO_2 از بافت‌ها به‌داخل گلبول‌های قرمز انتشار یافته و با گروه آمینوی موجود در انتهای آمینوی زنجیرهای هموگلوبین واکنش نموده تا تولید کربامینو-هموگلوبین شود (معادله ۱۳-۹). طی این واکنش یک پروتون آزاد می‌شود که جدایی O_2 از هموگلوبین را تسهیل می‌کند. O_2 به خارج گلبول قرمز و به‌داخل بافت انتشار می‌یابد. (b) واکنش‌هایی که در سطح ریه‌ها در داخل گلبول‌های قرمز رخ می‌دهند. در ریه، فشار بالای O_2 سبب انجام واکنش‌ها در جهت مخالف می‌شود که نتیجه آن دفع CO_2 از ریه‌ها است. واکنش‌ها عکس واکنش‌هایی هستند که در مویرگ‌ها رخ دادند.

آمینوی انتهای آمینو زنجیرهای پلی‌پپتیدی Hb تولید می‌شود (معادله ۱۳-۹). این واکنش تولید کربامینو $-$Hb همراه با تولید H^+ نیز می‌باشد.

$$HbNH_2 + CO_2 \rightleftharpoons HbNHCO_2^- + H^+ \qquad (۹-۱۳)$$

سپس H^+ اضافی تولیدی توسط کربامینو Hb به هموگلوبین اتصال یافته و شکل داکسی را تثبیت می‌کند که همراه با تسریع در آزادسازی و تحویل O_2 به سلول‌های دارای متابولیسم فعال می‌باشد (معادله ۱۰-۹ و شکل ۳۳-۹).

در ریه‌ها، غلظت بالای pO_2 سبب تولید $Hb(O_2)_4$ همراه با جدایی H^+ می‌شود (معادله ۱۰-۹). این افزایش در H^+ تفکیک گروه کربامینو را همراه با آزادسازی CO_2 (عکس معادله ۱۳-۹) تسریع می‌کند که از طریق ریه‌ها دفع می‌شود (شکل ۳۳-۹).

۳،۲-بیس‌فسفوگلیسرات (BPG) موجود در گلبول‌های قرمز خون، آزادسازی اکسیژن از هموگلوبین را تعدیل می‌کند

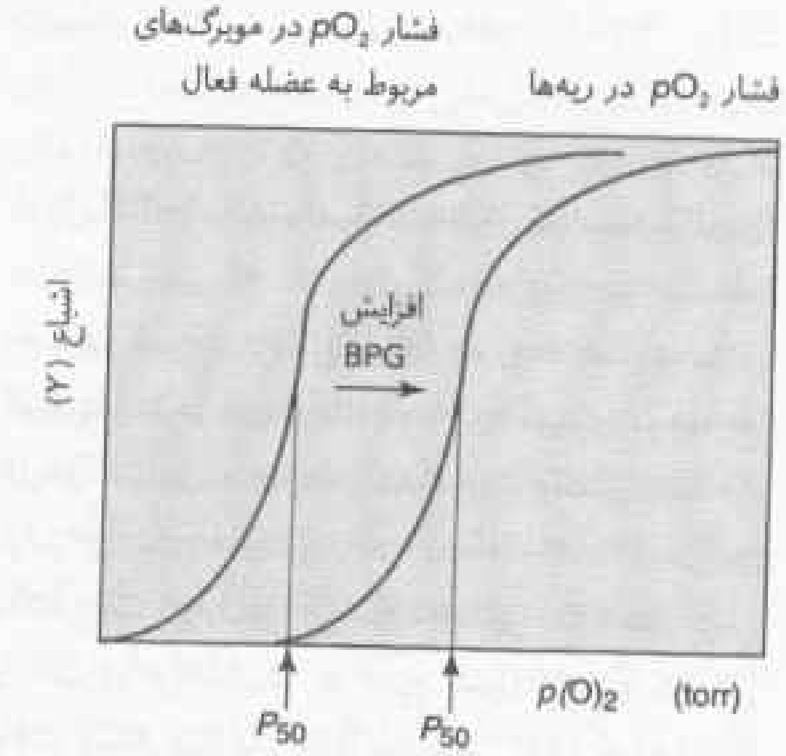
۳،۲-بیس‌فسفوگلیسرات (BPG) یا **۳،۲-دی‌فسفوگلیسرات (DPG)** یکی از تعدیل‌کننده‌های مهم تعادل هموگلوبین است (شکل ۳۴-۹). BPG در یک مسیر جزئی متابولیسم گلوکز تولید می‌شود و به میزان کمی در تمامی سلول‌ها وجود دارد. هر چند، در گلبول‌های قرمز خون این مسیر بسیار فعال است و غلظت BPG تقریباً برحسب مولار برابر غلظت هموگلوبین است. BPG به کونفورماسیون داکسی (T)، ولی نه اکسی (R)، اتصال می‌یابد. با اتصال BPG به Hb، کونفورماسیون T تثبیت شده و غلظت این کونفورماسیون نسبت به کونفورماسیون R افزایش می‌یابد. با تبدیل داکسی$-$Hb به اکسی$-$Hb، BPG جدا می‌شود (معادله ۱۴-۹).

$$H^+BPG\cdot Hb + 4O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_4 + BPG + nH^+ \qquad (۹-۱۴)$$

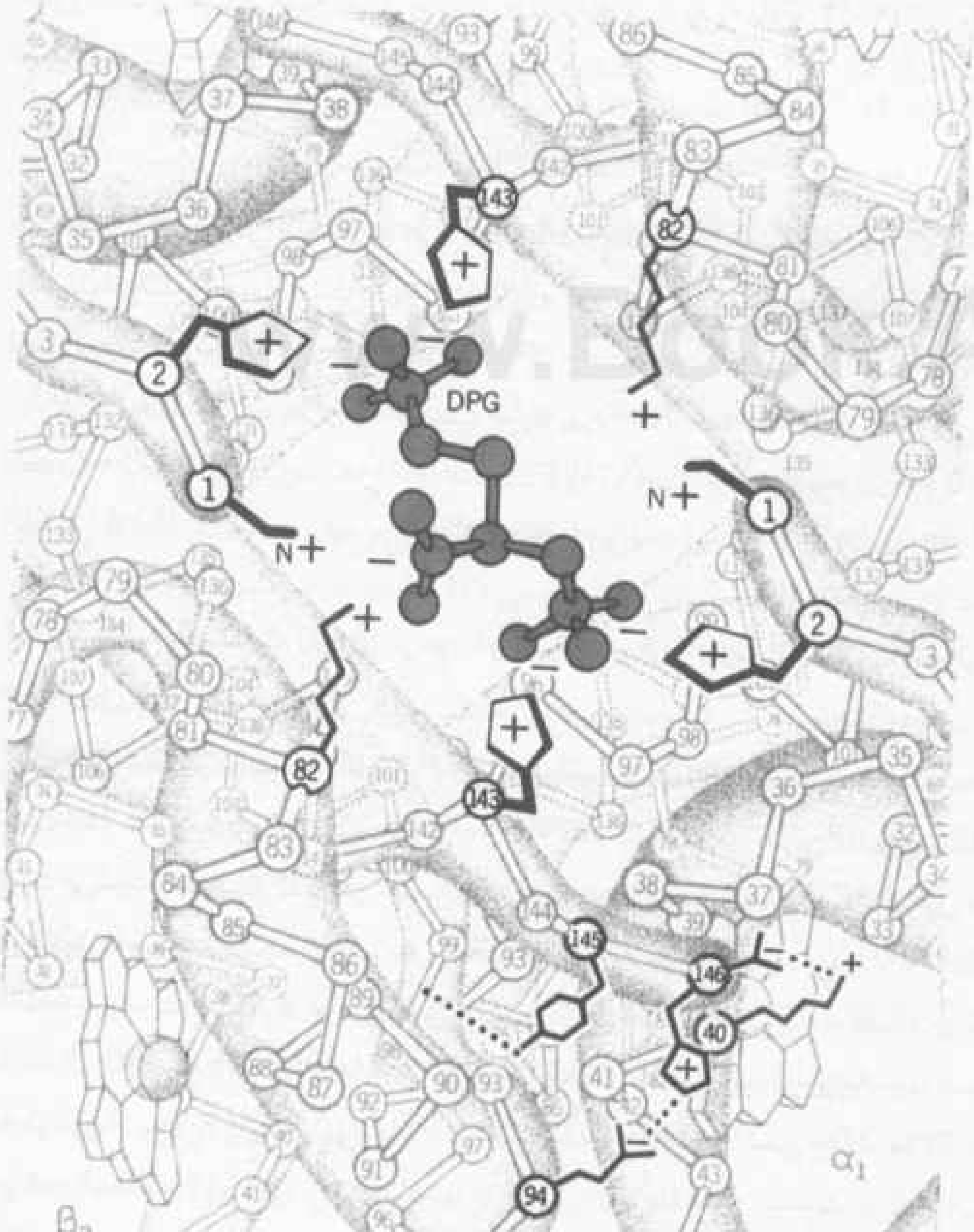
شکل ۳۴-۹ ساختمان ۳،۲-بیس فسفوگلیسرات (BPG). در pH ۷،۴ بار این ملکول ۵- است.

افزایش غلظت BPG تعادل (معادله ۱۴-۹) را به سمت چپ و در نتیجه نمودار اشباع را به راست می‌کشاند که همراه با افزایش P_{50} می‌باشد (شکل ۳۵-۹). برعکس، کاهش غلظت BPG این تعادل را به راست می‌کشاند که نتیجه آن شیفت نمودار به سمت چپ و کاهش P_{50} می‌باشد.

یک ملکول BPG واحد در داخل پاکتی اتصال می‌یابد که در فصل مشترک زیرواحد $\beta_1-\beta_2$ در کونفورماسیون T تشکیل می‌شود. در این محل هشت گروه با بار مثبت وجود دارند (شکل ۳۶-۹) که مربوط به ریشه‌های $His-143(\beta)$، $Lys-82(\beta)$، $His-2(\beta)$، و آمونیوم انتهای آمینوی هر دو زنجیر β می‌باشند. BPG بار ۵- دارد (شکل ۳۴-۹) و قویاً جذب بارهای مثبت جایگاه اتصالی فصل مشترک $\beta-\beta$ می‌شود. در کونفورماسیون R، اندازه این پاکت اتصالی کاهش‌یافته و نمی‌گذارد BPG بتواند به راحتی در داخل این پاکت قرار گیرد. لذا تبدیل T به R منجر به تفکیک BPG اتصال‌یافته می‌شود.

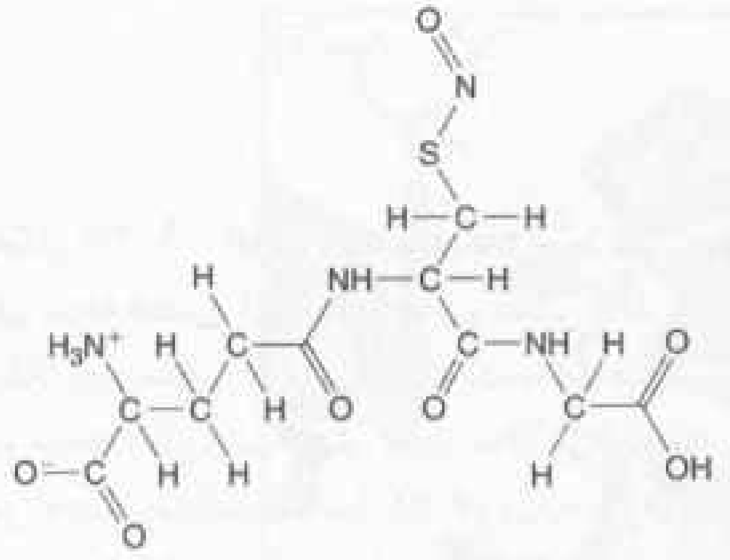


شکل ۳۵-۹ تغییر در منحنی اکسیژن- هموگلوبین به میزان بالاتر P_{50} با افزایش غلظت BPG.



شکل ۳۶-۹ جایگاه اتصالی بیس‌فسفوگلیسرات در فصل‌مشترک $\beta-\beta$ داکسی‌هموگلوبین. زنجیرهای جانبی با بار مثبت دو آمونیوم مربوط به $\beta Val-1$ انتهای آمینو، ایمیدازولیوم $\beta His-2$، ε-آمینوی $\beta Lys-82$ و ایمیدازولیوم $\beta 143-His$ نشان داده شده‌اند. ۳،۲-بیس‌فسفوگلیسرات دارای بار منفی به وسط حلقه حاصل از این گروه‌های دارای بار مثبت متصل می‌شود.

شرایطی که منجر به هیپوکسی (کمبود اکسیژن) می‌شوند، برای مثال کم‌خونی، استعمال دخانیات، و ارتفاع بالا، میزان BPG موجود در گلبول‌های قرمز خون را افزایش می‌دهند. برعکس، شرایط همراه با هیپراکسی منجر به کاهش مقادیر BPG می‌گردند. تغییر مقادیر BPG در داخل گلبول‌های قرمز خون، آهسته است و طی چندین ساعت و چندین روز انجام می‌شود تا تغییرات مزمن میزان pO_2 را جبران کند.



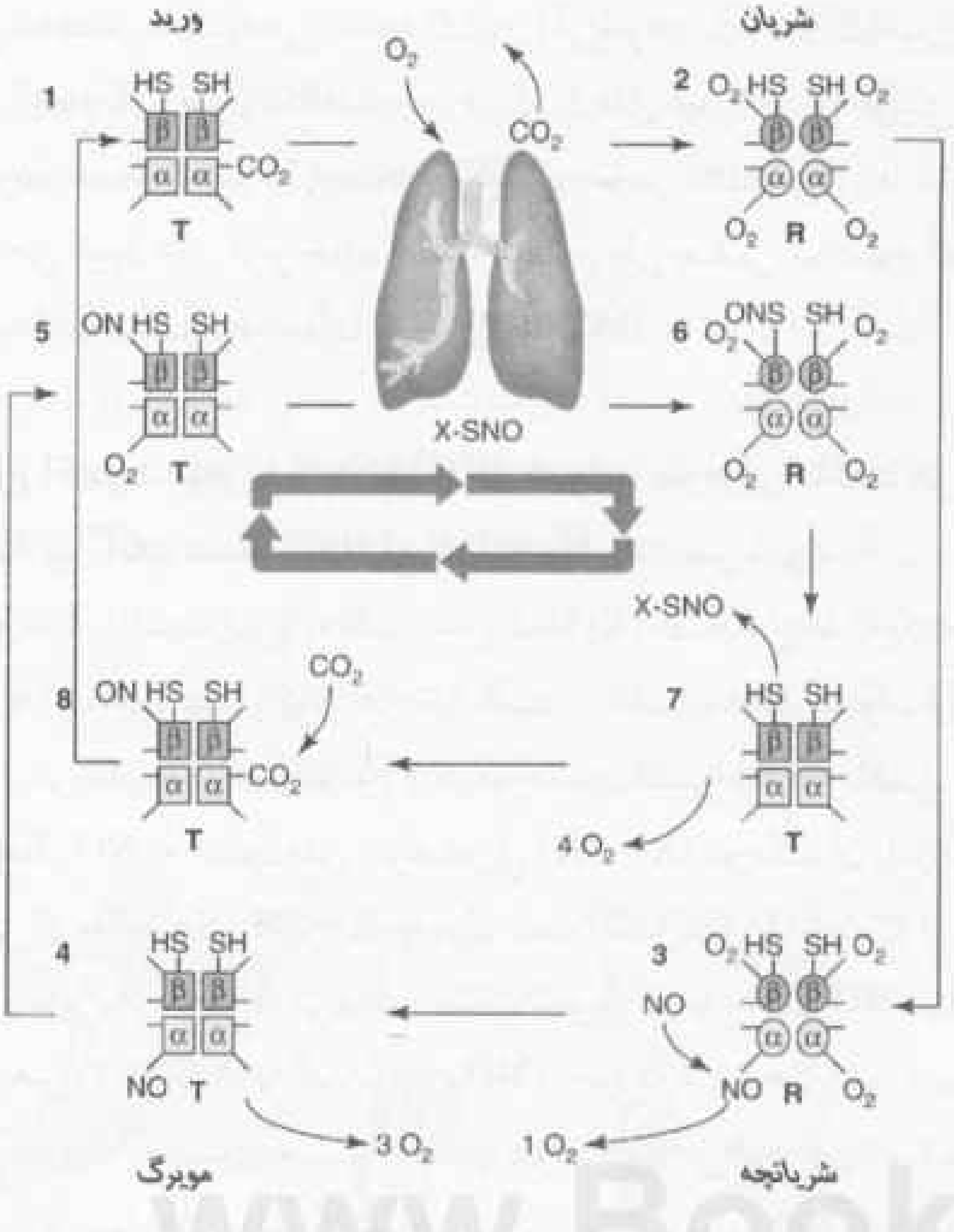
شکل ۳۷-۹ **انتقال‌دهنده X-S-NO .** گلوتاتیون (γ-گلوتامیل سیستئینیل-گلیسین) NO را به شکل متصل به سولفیدریل زنجیر جانبی سیستئین خود انتقال می‌دهد.

هموگلوبین اکسید نیتریک (NO) را به دیواره مویرگی بافت‌ها تحویل می‌دهد که در آنجا سبب تسریع در تحویل O_2 می‌شود

هموگلوبین به شکل برگشت‌پذیری به اکسید نیتریک (NO) اتصال می‌یابد که یک متسع‌کننده عروقی قوی با نیمه‌عمر بسیار کوتاه در خون است. با اتصال NO، هموگلوبین آن را از تخریب پنهان می‌کند. وقتی هموگلوبین از کونفورماسیون اکسی (R) به داکسی (T) تغییر می‌کند، با انتقال NO به ملکول‌های سولفیدریل (X−SH) کوچک، آن را آزاد می‌سازد. گلوتاتیون یکی از ملکول‌های X−SH معمول است (شکل ۳۷-۹). ترکیب X-S-NO به تثبیت NO در برابر تخریب ادامه می‌دهد و امکان تحویل کارآمد معادل NO دارای فعالیت بیولوژیکی (یعنی، X-S-NO) به گیرنده‌های NO موجود در سلول‌های دیواره عروق خونی را فراهم می‌سازد و به موجب آن سبب شل‌شدن دیواره عروق می‌شود. این شل‌شدن، انتقال گازها بین خون و سلول‌های بافتی را تسریع می‌کند. غلظت مولی NO در خون برابر یک هفتادم غلظت Hb می‌باشد. هر چند، به دلیل فعالیت بیولوژیکی قوی X-S-NO، این غلظت پایین از نظر فیزیولوژیکی مهم است.

ابتدا NO توسط Fe^{2+} در هِم تسخیر شده و سپس به گروه سولفیدریل ریشه‌های سیستئین-۹۳ زنجیر β (βCys^{93}) انتقال داده می‌شود. در کونفورماسیون T، آهن هِم ترجیحاً به NO اتصال می‌یابد. وقتی هموگلوبین در کونفورماسیون R قرار دارد، این NO به βCys^{93} انتقال می‌یابد. سپس وقتی R برای تحویل O_2 به بافت‌ها، دوباره به کونفورماسیون T تغییر می‌یابد، NO از βCys^{93} به ملکول‌های کوچک X-SH نظیر گلوتاتیون انتقال پیدا می‌کند (اشکال ۳۷-۹ و ۳۸-۹). اثر خالص، تبدیل NO پلاسمایی ناپایدار به X-S-NO پایدار توسط هموگلوبین می‌باشد.

شکل ۳۹-۹ ناحیه‌ای از هموگلوبین را نشان می‌دهد که حاوی $\beta Cys^{93}-S-NO$ است. در کونفورماسیون T، S-NO در خارج قرار داشته و در دسترس ملکول‌های گلوتاتیون می‌باشد. بدین ترتیب، امکان انجام ترانس‌نیتروزیلاسیون فراهم می‌گردد. برعکس در کونفورماسیون R، $\beta Cys^{93}-SH$ به سمت آهن هِم بوده و در دسترس حلال موجود در خارج قرار ندارد. فاصله بین آهن هِم و βCys^{93} در کونفورماسیون R برای انتقال NO از هِم به $\beta Cys^{93}-SH$ مطلوب است. لذا تغییرات کونفورماسیونی در ملکول هموگلوبین، حاصل از تغییر در فشار اکسیژن بین ریه‌ها و بافت‌ها، برداشت NO توسط βCys^{93} و



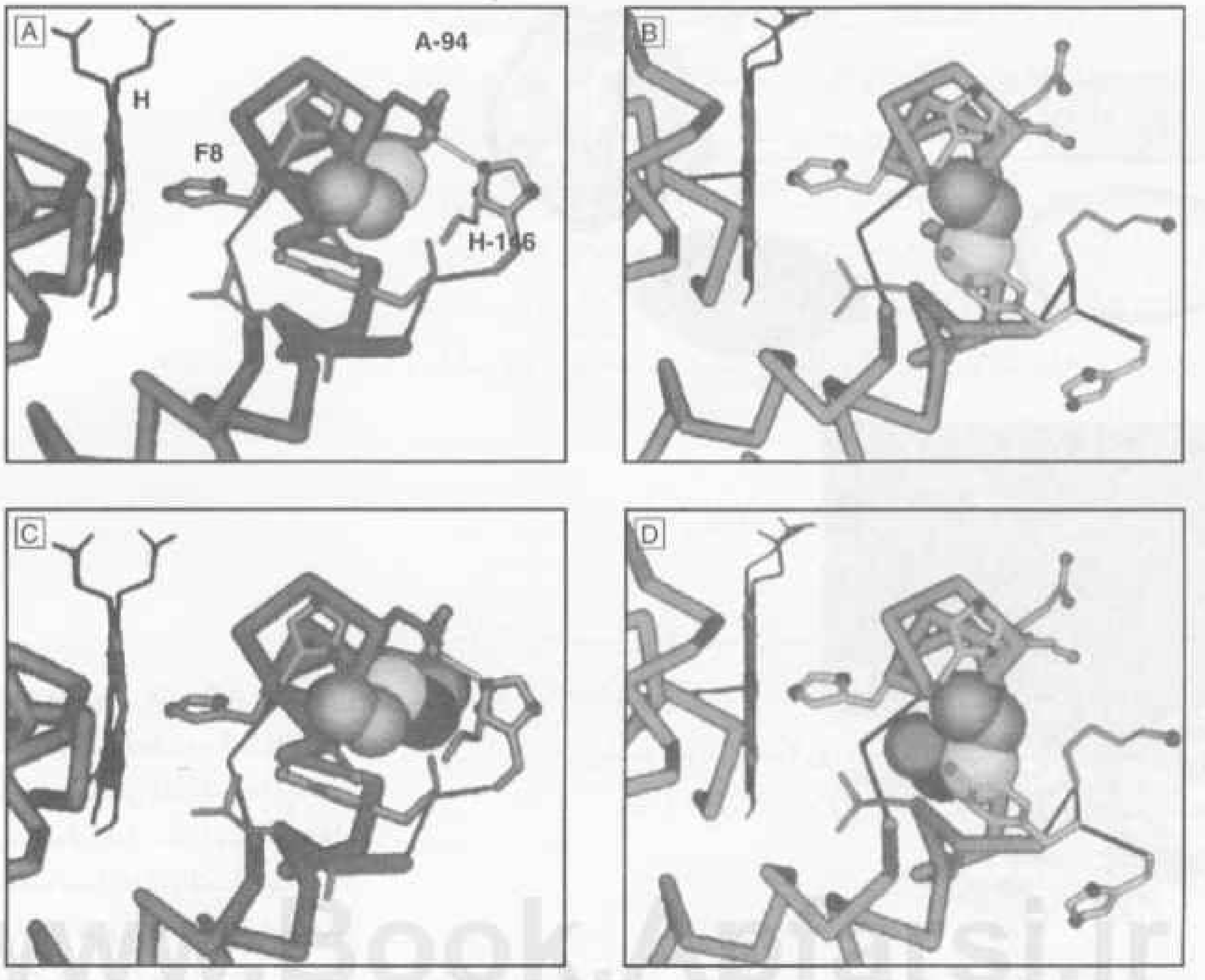
شکل ۳۸-۹ اتصال و آزادسازی NO توسط هموگلوبین طی چرخه تنفسی. این مدل اتصال و جدایی NO، O_2، و CO_2 را در هنگامی نشان می‌دهد که یک ملکول هموگلوبین، دو چرخه کامل را در گردش خون انجام می‌دهد. اولین چرخه مستلزم ترکیبات واسط ۱ تا ۴ و چرخه دوم مستلزم ترکیبات ۵ تا ۸ است. کونفورماسیون‌های T و R نشان داده شده‌اند و گروه‌های SH مربوط به زنجیر جانبی βCys^{93} هستند. NO مستقیماً یا به آهن هِم و یا به $\beta Cys^{93}SH$ اتصال می‌یابد.

مراحل کلیدی در انتقال NO شامل اتصال ابتدایی آن به یک هِم در ترکیب واسط ۳ و انتقال از یک هِم زیرواحد β به βCys^{93} در ترکیب واسط ۶ (کونفورماسیون R)، و انتقال آن به یک ملکول کوچک تیول X-SH در ترکیب واسط ۷ (کونفورماسیون T) در هنگام تبدیل هموگلوبین از R به T می‌باشد. به‌دلیل غلظت مولی نسبتاً پایین NO موجود در خون، ملکول هموگلوبین شرح‌داده‌شده ممکن است یکی از هزار ملکول هموگلوبینی باشد که این چرخش را انجام می‌دهد.

آزادسازی NO از آن را تنظیم می‌کند. اثر خالص، تحویل NO دارای فعالیت بیولوژیک به مویرگ‌های بافتی تحت فشار اکسیژن پایین می‌باشد.

۵-۹ • کمپلکس پروتئینی لامینای پایه

یک **لامینای پایه** یک کمپلکس شدیداً سازمان‌یافته از پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی است که با میکروسکوپ به صورت یک ناحیه شدیداً متراکم با ضخامت حدود ۵۰ تا ۱۰۰ nm در اطراف بافت‌ها و سلول‌ها مشاهده می‌گردد (شکل ۴۰-۹). واژه **غشاء پایه** اشاره به هم لامینای پایه و هم کلاژن‌های فیبریلی متصل‌کننده اتصال‌یافته به خارج آن دارد. غشاء پایه از بافت‌ها حمایت کرده و دسترسی سلول‌ها به استرومای بینابینی را تنظیم می‌کند. غشاء پایه همچنین در تعیین خصوصیات سلول‌هایی نقش دارد که به آن اتصال می‌یابند؛ از جمله این خصوصیات می‌توان به فرایندهای مهم تقسیم، مرگ (آپوپتوز)، تمایز و مهاجرت سلولی اشاره نمود. تمامی سلول‌ها اجزاء غشاء پایه را تولید می‌کنند و هر غشاء پایه، خصوصیات نوع سلولی را دارد که از آن سنتز می‌شود. یک غشاء پایه در زیر صفحاتی از سلول‌های اپی‌تلیال و آندوتلیال قرار دارد و انواع دیگر سلول‌ها را احاطه می‌کند (شکل ۴۰-۹). در گلومرول‌ها، یک غشاء پایه دو صفحه از سلول‌ها را از یکدیگر جدا کرده و در این محل به عنوان صافی عمل می‌کند.



شکل ۳۹-۹ ساختمان βCys^{93} و $\beta Cys^{93}-S-NO$ در کونفورماسیون‌های T و R. در تمامی این ساختمان‌ها لبه هِم (H، قرمز) به سمت خواننده است و به شکل متصل به ایمیدازول هیستیدین پروگزیمال (F8) نشان داده شده است. دو کربن (خاکستری) و سولفور (زرد-سبز) زنجیر جانبی Cys-93 با مدل‌های فضا پرکن نشان داده شده‌اند. در قسمت‌های C و D، NO که اتم N آن به رنگ آبی و اتم O آن به رنگ قرمز است، به سولفور βCys^{93} متصل می‌باشد.

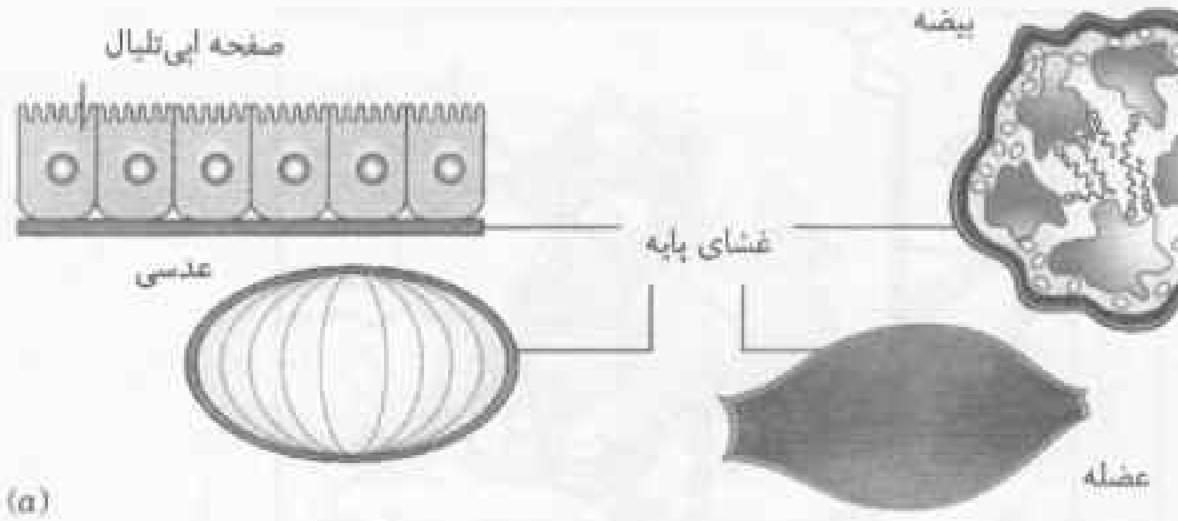
A. کونفورماسیون داکسی (T) که در آن زنجیر جانبی $\beta Cys^{93}(-CH_2-SH)$ در سطح ملکول و به دور از هِم قرار دارد. توسط جفت یونی با پیوند هیدروژنی (پیوند بین گروه‌ها به رنگ زرد نشان داده شده است) بین ایمیدازولیوم βHis^{146} و کربوکسیلات βAsp^{94} در بالا راست و در پشت زنجیر جانبی $\beta Cys^{93}-SH$، از ورود این زنجیر جانبی سیستئینی به داخل جایگاه اتصالی هِم جلوگیری می‌شود.

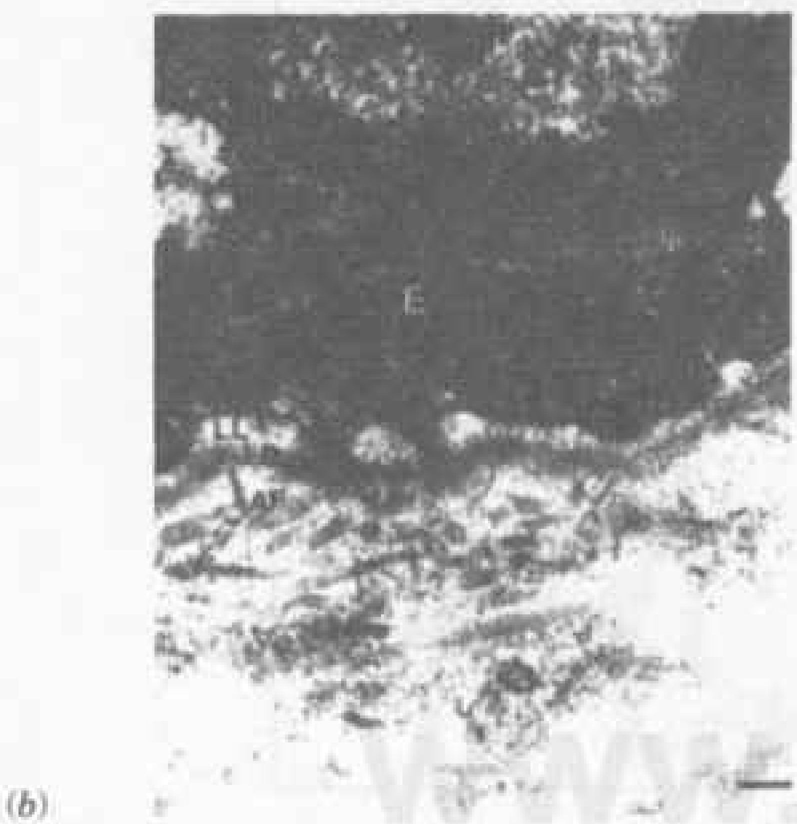
B. کونفورماسیون اکسی (R) با زنجیر جانبی βCys^{93} به سمت هِم و به دور از حلال در سمت خارج ملکول. پل نمکی بین βHis^{146} و βAsp^{94} در کونفورماسیون R شکسته می‌شود که امکان تاشدن $\beta Cys-SH$ به‌سمت پاکت هِم را فراهم می‌سازد.

C. مدل $\beta His^{93}-SNO$ در کونفورماسیون داکسی (T). SNO در سمت خارج قرار گرفته که برای واکنش با ملکول‌های کوچک X-SH در حلال در دسترس قرار دارد. همانند A توسط جفت یونی $\beta His^{146}-\beta Asp^{94}$ از ورود زنجیر جانبی سیستئین به داخل جایگاه هِم جلوگیری می‌شود.

D. مدل $\beta His^{9}-SNO$ در کونفورماسیون اکسی (R). SNO در نزدیکی هِم و به دور از حلال مدفون می‌شود. این کونفورماسیون سبب تسهیل در انتقال NO از یون هِم به SH سیستئین شده و مانع واکنش $\beta Cys^{93}-SNO$ با ملکول‌های X-SH در حلال می‌شود.

لامینای پایه با پیوستن غیرکووالان جایگاه‌های اختصاصی موجود در دومن‌های اتصالی این پروتئین‌های به‌هم‌پیوسته تولید می‌شود. همچنین تعداد زیادی از پروتئین‌های غشاء پایه از طریق دومن‌های اتصالی سلولی موجود در پروتئین‌ها و پروتئین‌های گیرنده موجود در غشاء خارجی سلول، به سلول‌ها اتصال می‌یابند. ساختمان بسیاری از این پروتئین‌ها متشکل از واحدهای قطعه‌ای با هُمولوژی توالی و تاشدگی با سوپرفولدهای معمول، نظیر ایمونوگلبولین (Ig) و فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، می‌باشد.





شکل ۴۰-۹ **غشاءهای پایه.** (a) دیاگرام غشاءهای پایه احاطه‌کننده بافت‌ها و انواع سلول‌های مختلف. (b) میکرو-گراف الکترونی که ماوراء ساختمانی ماتریکس خارج‌سلولی با غشاء پایه مجاور سلول اپی‌تلیال (E) را نشان می‌دهد. لامینا لوسیدا (LL) و لامینا دنسا (LD)، یا لامینای پایه غشاء پایه نشان داده شده است. در زیر لامینا دنسا، استرومای ماتریکس خارج‌سلولی قرار دارد. میله معادل ۱۰۰ nm است.

این فولدها به شکل تکراری یافت می‌شوند و بلوک‌های ساختمانی پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی هستند. در حالی‌که به‌نظر نمی‌رسد قطعات EGF موجود در داخل این پروتئین‌ها حاوی فعالیت مربوط به فاکتور رشد باشند، فاکتور رشد و پروتئین‌های سیتوکینی در داخل لامینای پایه، به‌خصوص مرتبط با قسمت‌های کربوهیدرات اجزاء پروتئوگلیکانی، یافت می‌شوند. طی نوسازی غشاء پایه که توسط پروتئازها و هپارانازها[1] القاء می‌شود، این فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها آزاد شده تا بر روی سلول‌های مجاور اثر کنند. به‌علاوه، بسیاری از پروتئین‌های لامینای پایه، فعالیت‌های نهفته‌ای را دارند که در هنگام شکستن توالی کامل با عمل پروتئازها نمایان می‌شوند (آندواستاتین را ببینید، ص. ۱۳۵۵). پرو-پروتئاز پلاسمینوژن به شکل فراگیری در داخل ماتریکس خارج‌سلولی وجود دارد و توسط ترشحات سلولی فعال‌کننده‌های پلاسمینوژن فعال می‌شود (ص. ۱۳۲۲).

ترکیب پروتئینی لامینای پایه

لامینای پایه متشکل از کلاژن نوع IV، لامینین، نیدوژن (انتاکتین نیز نامیده می‌شود)، و پرلکان[2] (یک پروتئوگلیکان هپارین سولفات) است. به علاوه، مقادیر جزیی احتمالاً ۵۰

1. Heparanases 2. Perlecan

پروتئین دیگر، شامل استئوپونتین[1] (BM-40 یا SPARC نیز نامیده می‌شود)، فیبیولین[2]، کلاژن نوع XV، کلاژن نوع XVIII و پروتئوگلیکان اگرین[3]، ممکن است وجود داشته باشند. تنـوع ویژگی بافتی یک غشاء پایه تـوسط ایزوفرم‌های کلاژن نـوع IV و لامینین و انـواع پروتئین‌های جزئی موجود تعیین می‌شود. ایزوفرم‌های کلاژن نوع IV توسط هفت نوع ژن کلاژن مختلف تولید می‌گردند. این ایزوفرم‌ها هُمولوژی ساختمانی مشترکی دارند، ولی از نظر توالی اسید آمینه‌ای خود تا ۵۰-۳۰٪ متفاوت می‌باشند. حداقل ۱۲ ایزوفرم متفاوت لامینین وجود دارند. ایزوفرم‌های کلاژن نوع IV و لامینین تولیدی، مختص نوع سلول و بافتی هستند که غشاء پایه مربوطه را سنتز می‌کنند.

ساختمان ملکولی لامینای پایه از شبکه‌های لامینین و کلاژن نوع IV تولید می‌شود

ساختمان کمپلکس پروتئینی لامینای پایه از طریق اتصال شبکه‌های مسطحی از لامینین و کلاژن نوع IV تولید می‌شود. ملکول‌های نیدوژن/انتاکتین و پروتئوگلیکان پرلکان این شبکه‌ها را بیکدیگر متصل می‌کنند. ساختمان پلیمری لامینین تولید غشاء پایه را آغاز می‌کند که با اتصال آن به گیرنده‌های سلولی تسهیل می‌گردد (شکل ۴۱-۹).

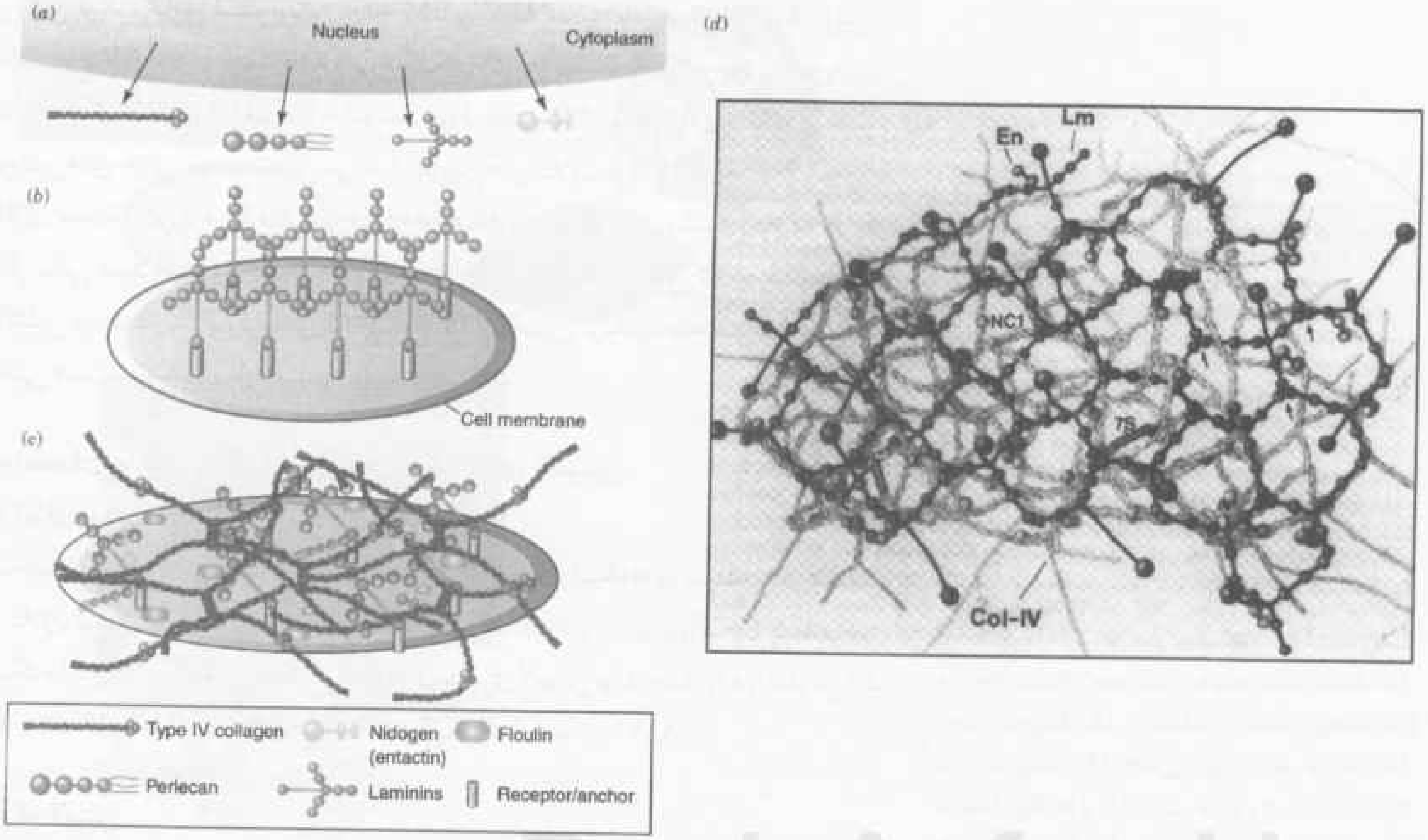
شبکه لامینین

لامینین متشکل از سه زنجیر پلی‌پپتیدی (α، β و γ) است که از طریق پیوندهای دی‌سولفیدی با یکدیگر اتصال عرضی دارند. هر کدام از این زنجیرها حاوی حدود ۱۵۰۰ اسید آمینه هستند و وزن ملکولی ایزوفرم لامینین-۱ حدود ۸۰۰ kDa می‌باشد. ساختمان کلی همانند یک صلیب نامتقارن به‌نظر می‌رسد (شکل ۴۲-۹). این ساختمان صلیبی حاوی سه بازوی کوتاه است که هر کدام از آنها توسط یک زنجیر متفاوت و یک بازوی بلند متشکل از هر سه زنجیر تولید می‌شود. پنج ژن متفاوت برای کدنمودن یک زنجیر α و سه ژن برای هر کدام از زنجیرهای β و γ وجود دارد که با یکدیگر ترکیب شده و حداقل ۱۲ ایزوفرم متفاوت $\alpha\beta\gamma$ تولید می‌کنند. دومن‌های متفاوت موجود در این ساختمان به پرلکان و نیدوژن اتصال یافته و حداقل دو دومن حاوی جایگاه‌های اتصالی برای گیرنده‌های سطح سلولی هستند. نزدیک سطح سلول، ملکول‌های لامینین به یکدیگر پیوسته و از طریق تعاملات بین جایگاه‌های اتصالی موجود در دومن‌های مربوط به بازوهای کوتاه ساختمان صلیبی، تولید یک ساختمان شبکه‌ای صفحه- مانند می‌کنند (شکل ۴۳-۹).

شبکه کلاژن نوع IV

ملکـول‌های کلاژن حاوی سه زنجیر پلی‌پپتیدی هستند کـه در ابتدا از طریق تعاملات غیرکووالان به یکدیگر می‌پیوندند (ص ۱۴۰). کلاژن‌های تولیدکننده فیبریل، نظیر کلاژن

1. Osteopontin 2. Fibulin 3. Agrin

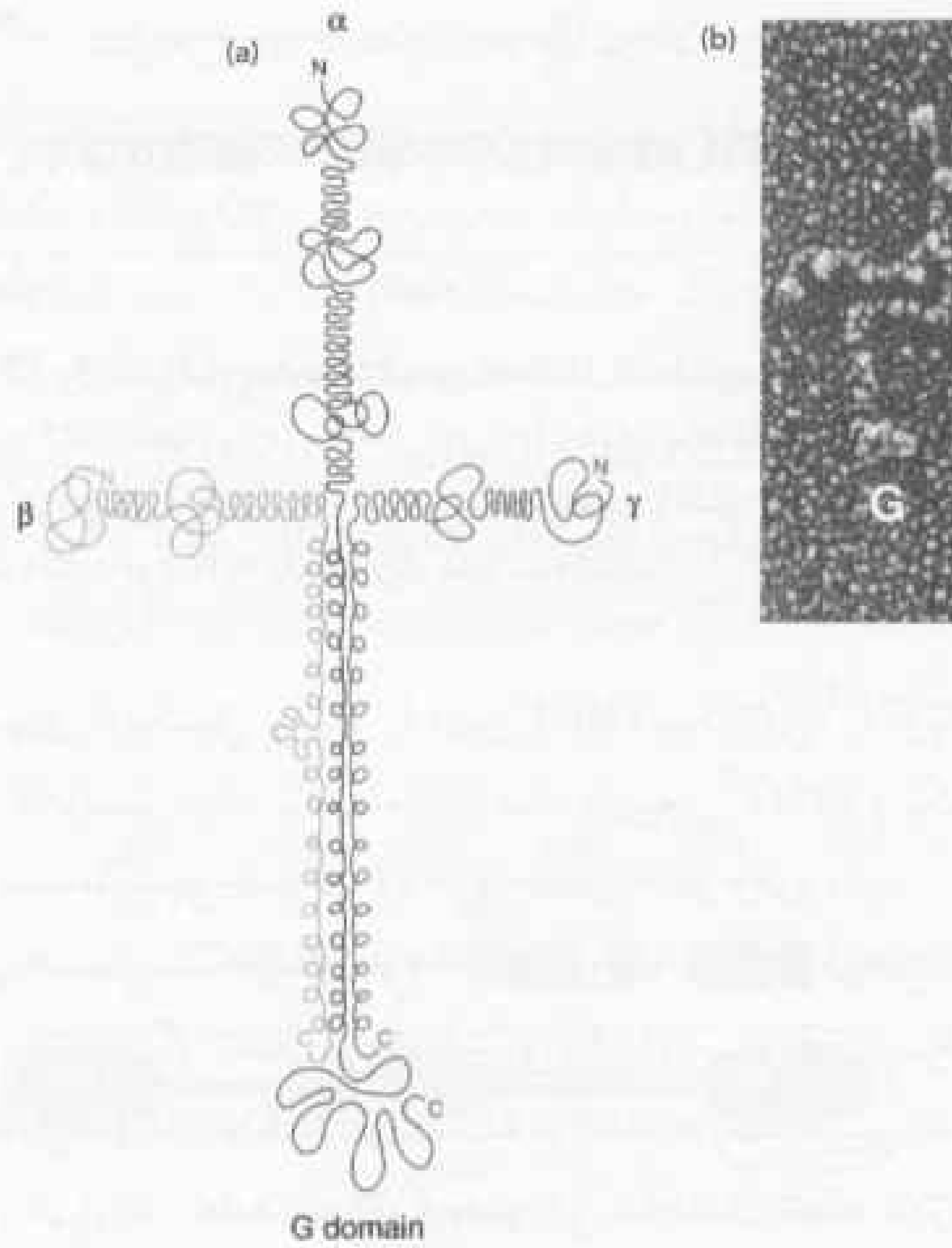


شکل ۴۱-۹ ساختمان ملکولی لامینای پایه. لامینین و ملکول‌های کلاژن نوع IV به هم پیوسته تا ساختمان‌های شبکه‌ای صفحه - مانندی به‌وجود آیند که توسط پروتئین‌های نیدوژن/انتاکتین و توسط پروتوگلیکان هپاران سولفات پرلکان متصل شده‌اند. (a) سنتز پروتئین‌های غشاء توسط سلول. (b) همایش شبکه لامینین با اتصال لامینین به گیرنده سطح سلول آغاز می‌شود. (c) همایش شبکه کلاژن نوع IV و همایش پروتئین‌هایی که به داربست‌های کلاژن نوع IV و لامینین می‌پیوندند. (d) شبکه کلاژن نوع IV که از طریق تعاملات دومن NC1 و 7S همراه با ایجاد پل انتاکتین/نیدوژن (En) بین شبکه‌های لامینین (Lm) و کلاژن متصل می‌شوند.

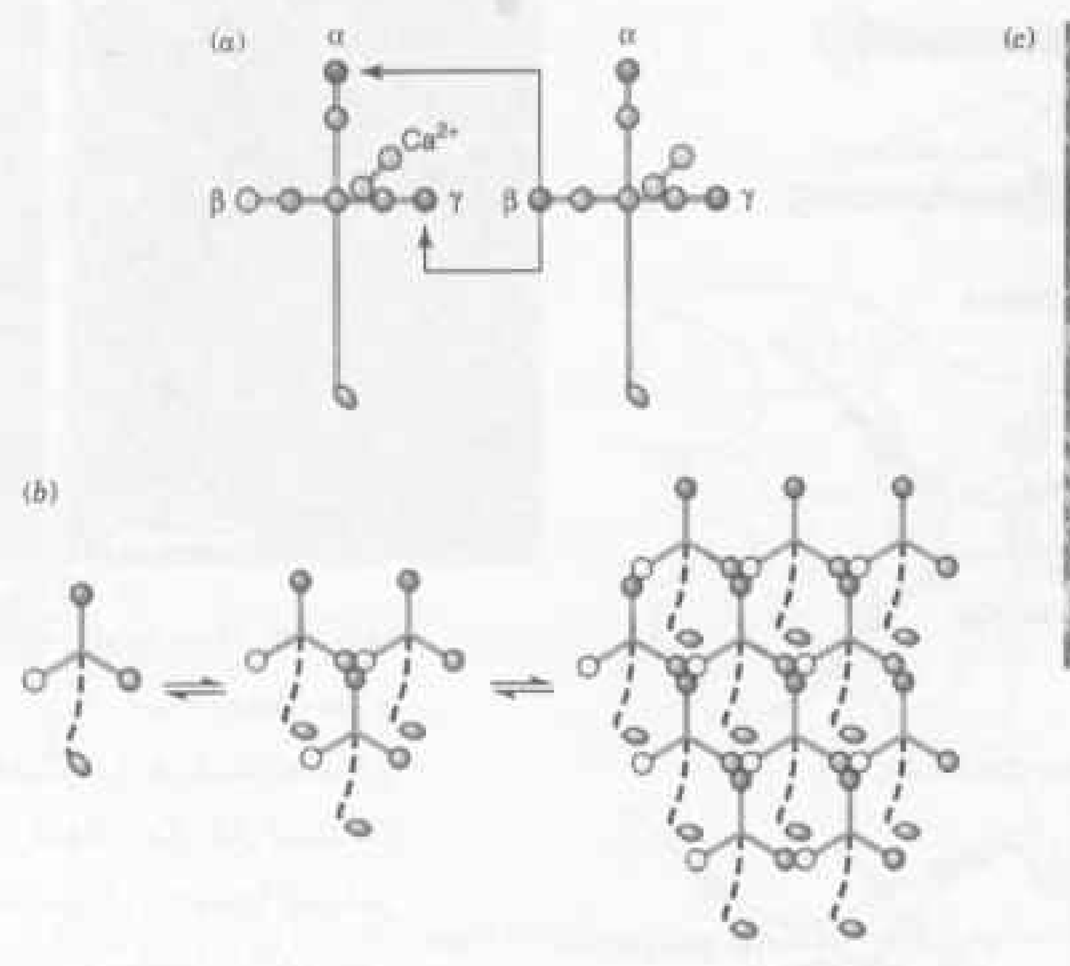
نوع I، حاوی قطعات بلندی از توالی‌های تکراری $(\text{Gly–Pro}-\text{X})n/(\text{Gly–Y–Hy Pro})n$ هستند که حاوی پرولین یا هیدروکسی‌پرولین (Hy Pro) و یک گلیسین تقریباً در هر ریشه سوم است (ص. ۱۴۲). هیدروکسی‌پرولین یک مشتق اسید آمینه‌ای است که توسط پرولین هیدروکسیلاز موجود در شبکه آندوپلاسمی از ریشه‌های موجود در داخل زنجیر پروکلاژن تازه‌ساز تولید می‌شود. محتوای بالای پرولین و هیدروکسی‌پرولین سبب ایجاد یک کونفورماسیون مارپیچی تحت عنوان مارپیچ پلی‌پرولین نوع II در این توالی می‌شود (ص ۱۴۳). این مارپیچ با سه ریشه در هر دور مارپیچ ($n = ۳$)، همراه با یک Gly در هر ریشه سوم مشخص می‌شود؛ ریشه‌های گلیسین تولید یک لبه گلیسینی طولی[1] در یک سمت مارپیچ می‌کنند که خود- پیوستگی سه پلی‌پپتید، هر کدام در یک کونفورماسیون مارپیچی پلی‌پرولینی، به یک ساختمان مارپیچی سه‌تایی یا فوق‌مارپیچی را تسریع می‌کند.

کلاژن نوع IV تولید ساختمان فیبریلی مثل نوع I نمی‌کند، در عوض یک شبکه لامینار صفحه-مانند را به‌وجود می‌آورد. پلی‌پپتیدهای کلاژن نوع IV حاوی نواحی با توالی

1. Longitudinal glycine edge

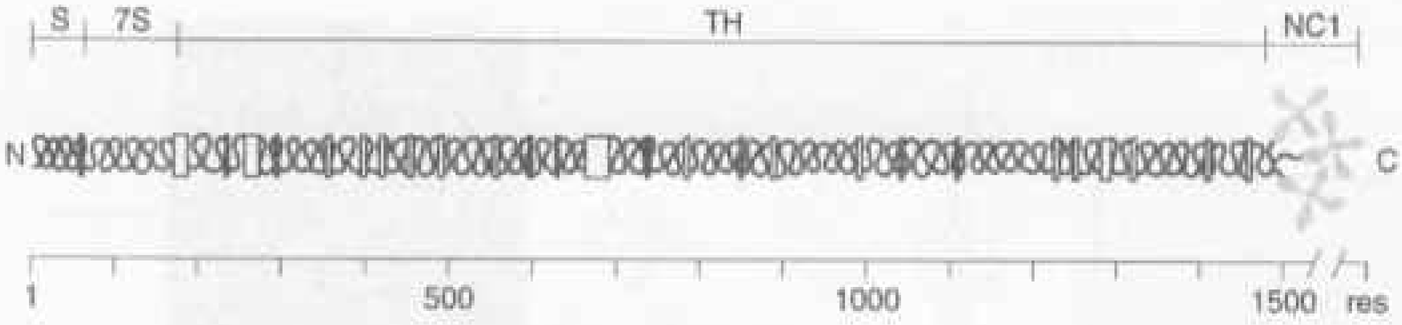


شکل ۴۲-۹   **ساختمان لامینین (ایزوفرم ۱).** *(a)* ساختمان دیاگرامی لامینین-۱. زنجیرهای α، β، و γ لامینین هر کدام از یک بازوی کوتاه ساختمان صلیبی. بازوی بلند توسط ساختمان فنر فنری‌شده نواحی مارپیچی α تمامی سه زنجیر همراه با زنجیر α لامینین امتدادیافته به خارج دومن G گلبولی انتهای کربوکسیل. بازوهای کوتاه متشکل از دومن‌های گلبولی هستند که توسط تکرارهای فاکتور رشد اپیدرمی-مانند (EGF-مانند) جدا می‌شوند. *(b)* نسخه المثنی ملکول لامینین با سایه گلیسرول-محوری مخالف-معکوس. انتهای آمینوی زنجیر α و دومن گلبولی (G) زنجیر α نشان داده شده است.



شکل ۴۳-۹   **تولید ساختمان شبکه‌ای لامینین.** (a) و *(b)* تعاملات اتصالی بین بازوهای کوتاه ملکول‌های لامینین مختلف منجر به ساختمان شبکه‌های صفحه-مانند می‌شود. انتاکتین به شکل متصل به بازوی کوتاه نشان داده شده است، ولی برای پلیمریزاسیون شبکه لامینینی مورد نیاز نیست. معتقدند بازوی بلند برای شرکت در تعاملات دیگر آزاد است. (c) شبکه لامینینی توسط المثنی‌های پلاتینیوم زاویه-بزرگ مشاهده می‌گردد.

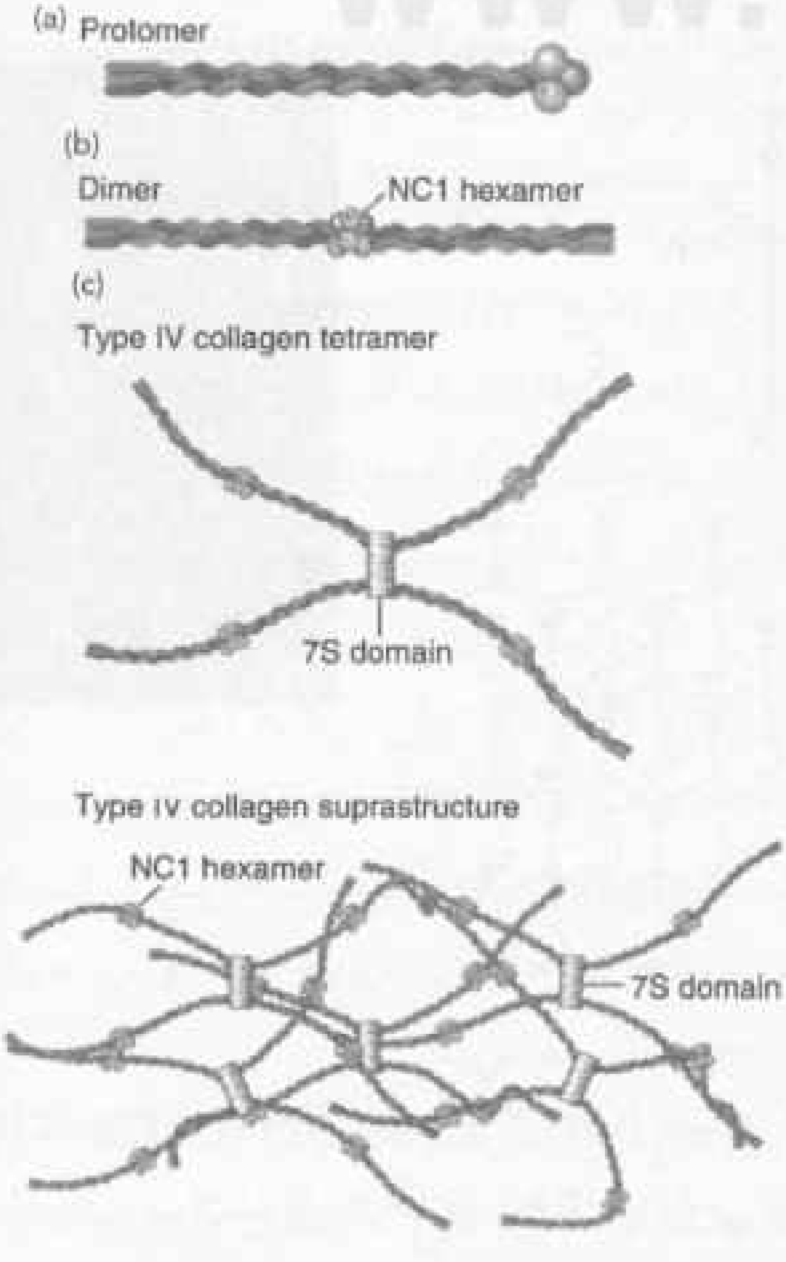
$(Gly{-}X{-}Pro)n/(Gly{-}HyPro{-}Y)n$ هستند که تولید نواحی میله‌ای- شکل سه-مارپیچی می‌کنند، ولی برخلاف نوع I این نواحی توسط دومن‌های رابط و گلبولی (کروی) که نواحی فوق مارپیچی را جدا می‌کنند، پراکنده هستند (شکل ۴۴-۹). دومن کروی موجود

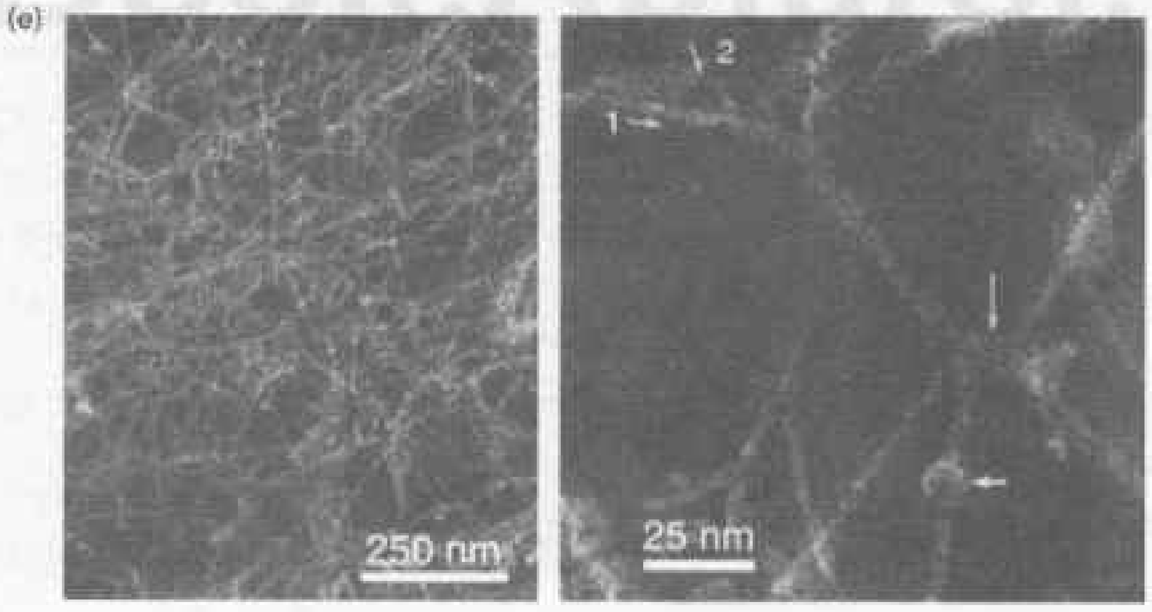


شکل ۴۴-۹ دیاگرام پروتومر کلاژن نوع IV متشکل از سه زنجیر پلی‌پپتیدی. خط بالا موقعیت ساختمان اول ناحیه NC1، ناحیه مرکزی سه-مارپیچی (TH) با یک ساختمان ابرمارپیچی، و ناحیه انتهای آمینوی 7S را نشان می‌دهد. میله‌های سیاه و جعبه‌ها موقعیت‌هایی را نشان می‌دهند که در آنها توالی Gly-X-Y در زنجیرهای کلاژن نوع IV به دفعات زیاد قطع شده است.

در انتهای کربوکسیل پروتومر را دومن NC1 (غیرکلاژنی ۱[1]) گویند. قبل از این دومن انتهای کربوکسیل، یک ناحیه مرکزی سه-مارپیچی[2] (TH) و یک لولا متصل به یک ناحیه سه-مارپیچی کوچکتر (7S) در انتهای آمینو وجود دارد.

در همایش شبکه کلاژن نوع IV، هر پروتومر از طریق تعامل NC1 به NC1 سر به سر به پروتومر دیگر اتصال می‌یابد (شکل ۴۵-۹). سپس این دیمرها از طریق نواحی 7S خود تعامل نموده تا تولید تترامر کنند که در ادامه به یکدیگر پیوسته و شبکه مسطحی را به وجود می‌آورند. تعاملات 7S، گره‌های این ساختمان شبکه کلاژنی هستند.



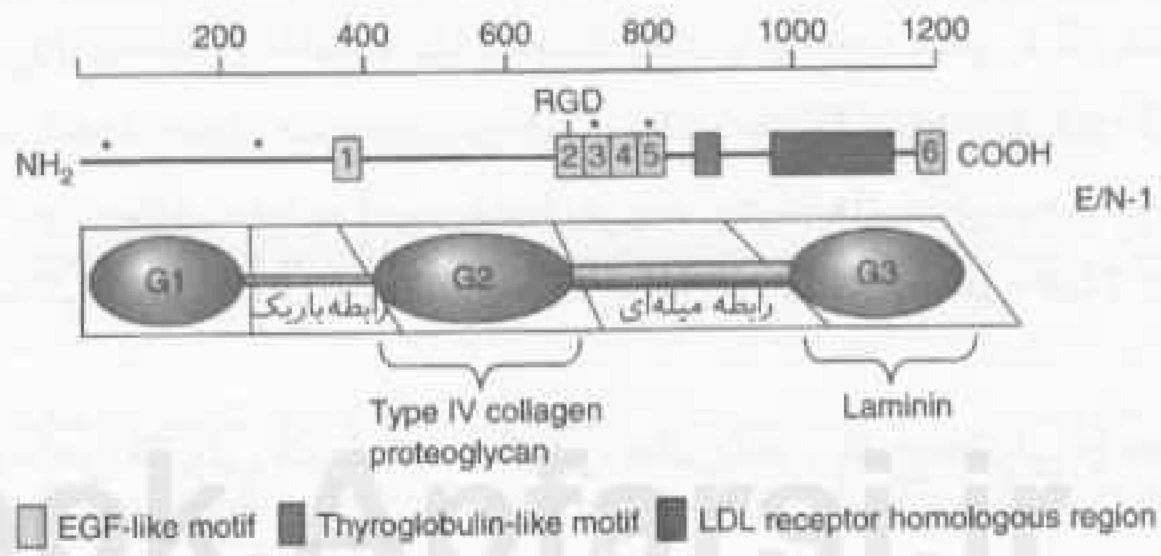


شکل ۴۵-۹ تولید ساختمان شبکه کلاژن نوع IV. تشریح دیاگرامی تولید شبکه. (a) ملکول پروتومری کلاژن نوع IV از سه زنجیر پلی‌پپتیدی (قرمز، ارغوانی، و آبی) در شبکه آندوپلاسمی و سلول گلژی تشکیل می‌شود. زنجیرهای کلاژن طوری در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند که نواحی 7S انتهای آمینو در یک انتها و نواحی NC1 انتهای کربوکسیل در انتهای دیگر قرار گیرند. (b) دو پروتومر از طریق دومن‌های NC1 خود اتصال یافته تا تولید دیمری از پروتومرها کنند (هر کدام سه رشته دارند، لذا تعامل بین دومن‌های C1 از شش زنجیر می‌باشد). (c) دو دیمر پروتومری از طریق نواحی 7S اتصال می‌یابند. (d) پلیمریزاسیون تترامرهایی از پروتومرها همراه با تولید شبکه کلاژن نوع IV می‌باشد. (e) این شبکه‌های کلاژن نوع IV توسط یک المثنی زاویه - بزرگ غشاء پایه آمنیوتیک در محل مشاهده می‌گردند.

1. Non-Collagenous 1　　2. Triple-helical

نیدوژن/ انتاکتین شبکه‌های لامینین و کلاژن نوع IV را بیکدیگر وصل می‌کند

دو ایزوفرم نیدوژن-۱ و نیدوژن-۲، ۴۶٪ هُمولوژی دارند. هر دو شکل متشکل از سه دومن کروی (G1، G2 و G3) می‌باشند که توسط یک ناحیه رابط بین G1 و G2 و یک ناحیه میله‌ای بلندتر بین G2 و G3 از یکدیگر جدا شده‌اند (شکل ۴۶-۹). دومن G3 یک فولد ملخی[1] متشکل از رشته‌های موازی ناهمسو β هستند که به‌صورت پره‌های یک ملخ هواپیما به‌نظر می‌رسند. این فولد مشابه یک فولد پروتئین گیرنده LDL است. نیدوژن‌ها از طریق تعامل فصل مشترک ملخ β- با دومن‌های لامینینی III و IV به لامینین اتصال می‌یابند (شکل ۴۷-۹). محل‌های دیگر موجود در نیدوژن با کلاژن نوع IV و پرلکان ایجاد کمپلکس می‌کنند (شکل ۴۸-۹).

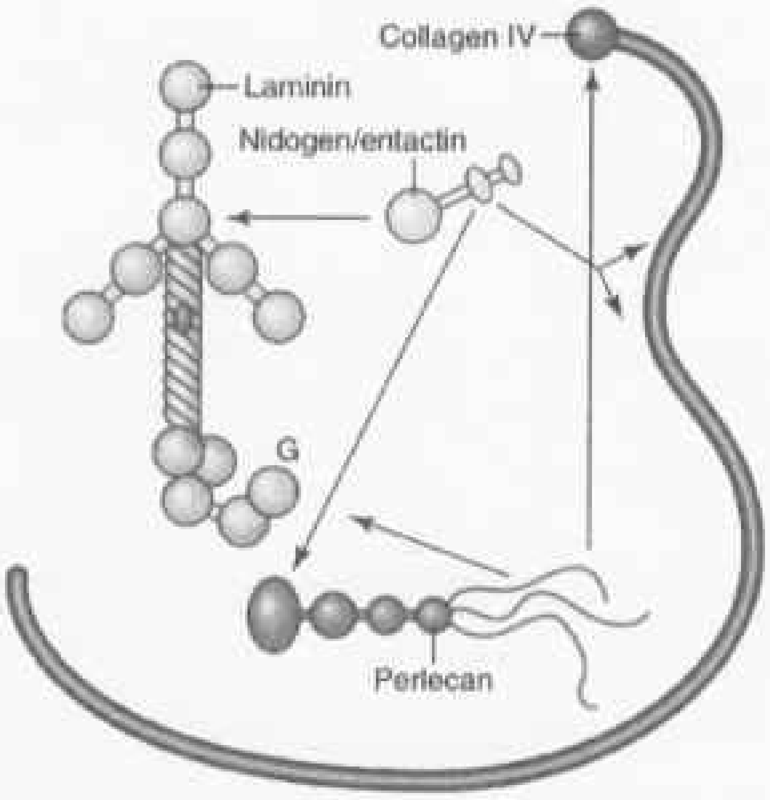


شکل ۴۶-۹ **ساختمان نیدوژن.** ساختمان شماتیک ملکول انتاکتین / نیدوژن-۱. جایگاه‌های اتصال به کلسیم بالقوه با ستاره مشخص شده‌اند. جایگاه‌های اتصالی برای کلاژن نوع IV و پروتئوگلیکان در دومن G2 و جایگاه اتصال به لامینین در دومن G3 قرار دارند. توالی RGD (Arg-Gly-Asp) به گیرنده‌های سلولی نوع اینتگرینی متصل می‌شوند.



شکل ۴۷-۹ **جزئیات ملکولی تعاملات ملکولی بین نیدوژن و لامینین.** (a) دیاگرام نواری کمپلکس β- ملخی نیدوژن G3 با گره‌های لامینین LE3-5. رشته‌های β موجود بر روی صفحه β شماره‌گذاری شده‌اند. (b) نمایی از تعامل نیدوژن با دومن لامینینی LE4 و قسمت مجاور دومن لامینین LE3. قسمت‌هایی از اسکلت نیدروژن به صورت مسیر C_α و زنجیرهای جانبی ایجادکننده این تعامل به رنگ طلایی نشان داده شده‌اند. پیوندهای هیدروژنی با خطوط سبز منقطع نشان داده شده‌اند.

1. Propeller



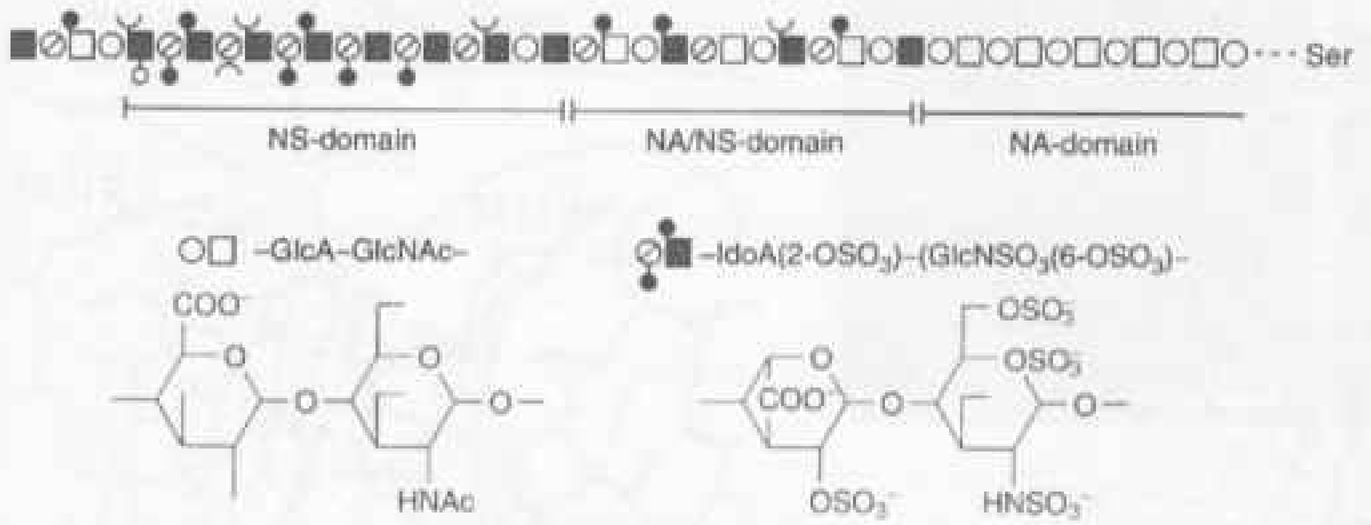
شکل ۴۸-۹ **تعاملات نیدوژن و پروتئوگلیکان پرلکان.** پیکان‌ها تعاملات اتصالی دومن-دومن را بین پروتئین‌های موجود در فوق‌ساختمان غشاء پایه نشان می‌دهند.

پروتئوگلیکان پرلکان هپاران سولفات شبکه‌های لامینین و کلاژن نوع IV را به یکدیگر متصل می‌کند

پرلکان (وزن ملکولی ۶۰۰ kDa) پروتئوگلیکان اصلی لامینای پایه است. پروتئوگلیکان‌ها یک هسته پلی‌پپتیدی دارند که توسط زنجیرهای جانبی سرین خود از طریق یک تتراساکارید به یک زنجیر گلیکوزآمینوگلیکان (GAG) متشکل از یک دی‌ساکارید حاوی یک قند آمینو (N- استیل‌گلوکزآمین و N-استیل‌گالاکتوزآمین) و یک اسید اورونیک (گلوکورونیک یا یُدورونیک) اتصال دارنـد. در پرلکان، GAG هپارین سولفات شدیداً سولفاته می‌باشد (شکل ۴۹-۹). هر پرلکان حاوی ۱۵-۲ زنجیر هپارین سولفات (GAG) است (شکل ۵۰-۹). زنجیرهای GAG سولفاته شدیداً بار منفی دارند و با اتصال به کاتیون‌ها و آب ایجاد ژل می‌کنند. نتیجه تولید یک فشار تورمی[1] می‌باشد که غشاء پایه را قادر می‌سازد تا در برابر نیروهای فشاری مقاومت نشان دهد. پرلکان با سه جزء اصلی دیگر غشاء پایه تعامل می‌کند؛ از طریق هسته پروتئینی خود با کلاژن نوع IV ارتباط دارد یا از طریق زنجیرهای هپاران سولفات خود به لامینین اتصال می‌یابد. جایگاه‌های دیگر موجود در هپاران سولفات به گیرنده‌های سلولی و همچنین فاکتورهای رشد دیگر نظیر $TGF-\beta$ اتصال می‌یابند.

تماس کانونی در غشاء سلولی، ماتریکس خارج‌سلولی را به اسکلت سلولی متصل می‌کند

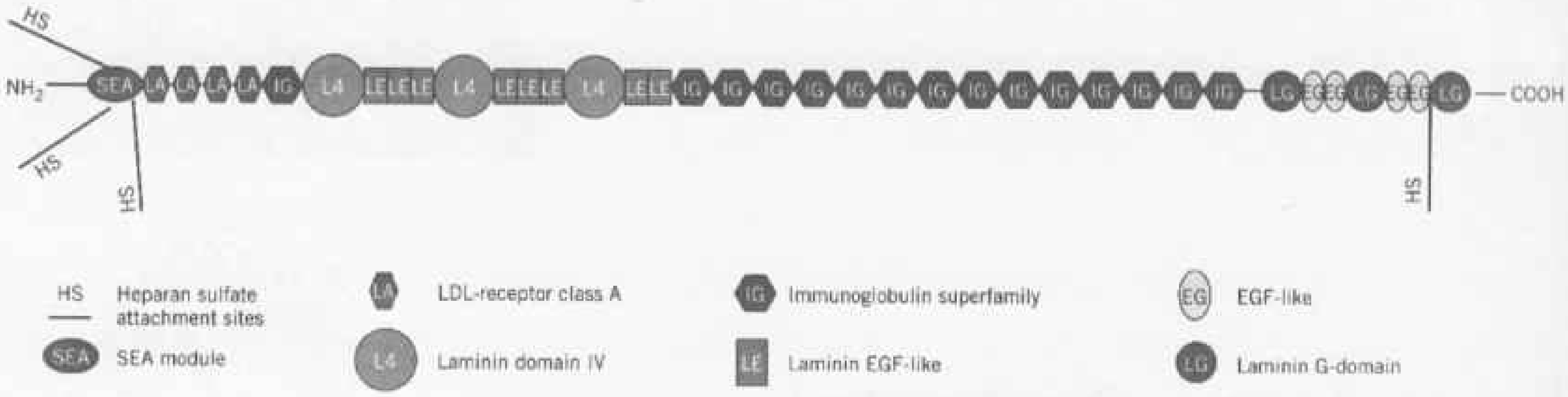
غشاء پایه یک کمپلکس پروتئینی خارج‌سلولی است که به کمپلکس پروتئینی اسکلت



شکل ۴۹-۹ **ساختمان یک زنجیر هپاران سولفات.** پلیمرهای GAG حاوی واحدهای یک در میان اسید هگزورونیک (اسید D-گلوکورونیک [GlcA] یا اسید L-یُدورونیک [IdoA]) و D-گلوکزآمین (GlcN) می‌باشند. GlcN در نواحی از زنجیر (ناحیه NA) N-گلیکوزیله است. در نواحی از پلیمر که بیشتر پردازش شده‌اند، گروه‌های N-استیل به‌طور نسبی توسط N-سولفات (نواحی NA/NS) و یاگروه‌های N-استیل به‌طور کامل توسط N-سولفات (نواحی NS) جایگزین شده‌اند. دایره توخالی، ۳-O- سولفات می‌باشد.

این پلیمرها به‌طریق C-5 اپیمریزاسیون GlcA به IdoA و نهایتاً با قرارگیری گروه‌های O-سولفات در موقعیت‌های مختلف، بیشتر پردازش می‌شوند. زنجیر هپاران از طریق ایجاد یک پیوند با یک زنجیر جانبی سرین به پروتئین مرکزی اتصال می‌یابد.

1. Swelling pressure



شکل ۵۰-۹ **سازماندهی قطعه‌ای دومن‌ها در هسته پروتئینی پرلکان.** سازماندهی دومنی پرلکان موش خانگی. اتصال زنجیرهای هپاران سولفات (HS) نشان داده شده است. دومن‌های موجود عبارتند از SEA (هُمولوگوس دومن یافت‌شده در پروتئین اسپرم توتیای دریایی، آنتروکیناز، و اگرین)؛ LA (هُمولوگوس دومن نوع Aگیرنده LDL)؛ L4 (هُمولوگوس دومن IV لامینین)، IG (دومن ایمونوگلبولین-مانند)؛ LE (هُمولوگوس با دومن فاکتور رشد اپیدرمی-مانند نوع لامینینی)؛ EG (فاکتور رشد اپیدرمی-مانند)؛ و LG (هُمولوگوس با دومن G- مانند لامینین).

سلولی داخل سلولی اتصال دارد، زیرا هر دو کمپلکس به پروتئین‌های گیرنده یکسان موجود در نواحی تماسی کانونی غشاءهای سلولی اتصال می‌یابند. این تعاملات اتصالی سلول-سلول، ماترکس خارج‌سلولی را به اسکلت سلولی متصل می‌کنند که برای تنظیم فرایندهای سلولی نظیر حرکت سلول، تقسیم سلول، و مرگ سلول مهم است. در اکثر سلول‌های سرطانی، اتصال کمپلکس پروتئینی گیرنده غشایی به هر دو کمپلکس‌های لامینای پایه خارج‌سلولی و پروتئین اسکلت سلولی شکسته می‌شود.

واژه‌های کلیدی

ملکول‌های آنتی‌بادی
نواحی ثابت و متغیر
قطعه F_{ab}
قطعه F_c
زنجیرهای H
هاپتن
ناحیه فوق‌متغیر
کلاس ایمونوگلبولینی
فولد ایمونوگلبولینی
زنجیرهای L
پروتئازهای سرینی
جایگاه-فعال جهت‌دار
دومن لوله β

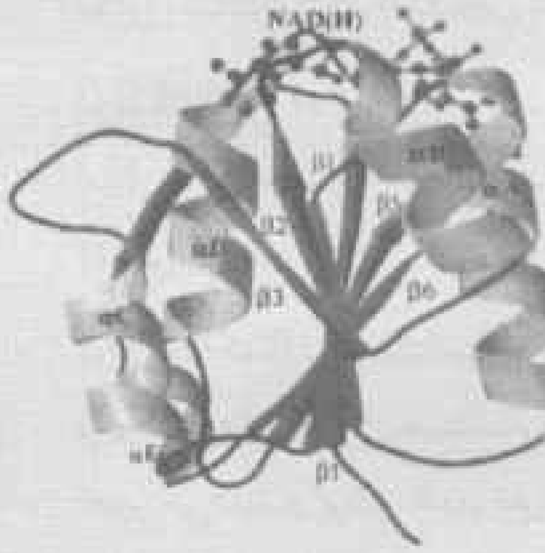
ریشه‌های کاتالیتیک
تکامل همگرا
آندوپپتیداز
اگزوپپتیداز
اسید γ-کربوکسی‌گلوتامیک
پروآنزیم
تثبیت حالت-انتقالی واکنش
هُمولوژی توالی
پروتئازهای سرینی
سرین
زیموژن
هموگلوبین
۳،۲-بیس‌فسفوگلیسرات

مکانیسم آلوستریک
اثر بوهر
کربامینو-هموگلوبین
انتقال CO_2
هیستیدین دیستال
HbA_1
HbF
ضریب هیل
میوگلوبین
انتقال NO
انتقال O_2
P_{50}
انحراف pK_a

همکاری مثبت
هیستیدین نزدیک
کونفورماسیون‌های R و T
لامینای پایه
غشاء پایه
شبکه کلاژن
تماس کانونی
شبکه لامینین
نیدوژن
پرلکان



۱۰



آنزیم‌ها: طبقه‌بندی، کینتیک و کنترل

ارتباطات بالینی

مفاهیم کلیدی

- آنزیم‌ها پروتئین‌هایی هستند که واکنش‌های شیمیایی را با افزایش سرعت تبدیل یک سوبسترای اختصاصی به یک محصول اختصاصی کاتالیز می‌کنند.
- آنزیم‌ها انرژی فعال‌سازی واکنش‌ها را با تثبیت سوبسترا به شکلی که امکان تولید محصول را فراهم می‌سازد، کاهش می‌دهند. این شکل را حالت انتقالی گویند.
- کوآنزیم‌ها که اکثراً از ویتامین‌ها مشتق می‌شوند، اجزاء ضرروی بسیاری از واکنش‌های آنزیمی هستند؛ برخی طی این واکنش‌ها از نظر شیمیایی تغییر می‌کنند و برخی بدون تغییر باقی می‌مانند. برخی اتصال کووالان به آنزیم دارند. برای فعالیت برخی آنزیم‌ها نیاز به یون‌های فلزی می‌باشد؛ این یون‌ها اغلب به پروتئین یا یک کوفاکتور اتصال دارند.
- شیمی تغییر شکل‌های شیمیایی با اصول شیمیایی عمومی نظیر کاتالیز اسید-باز و حمله نوکلئوفیلی مرتبط است. کاتالیز آنزیمی مؤثرتر است، زیرا گروه‌هایی که پروتونه می‌کنند (اسیدهای عمومی) یا دپروتونه می‌کنند (بازهای عمومی) و اسیدهای آمینه نوکلئوفیلی، قسمتی از آنزیم هستند.
- سرعت واکنش‌ها با غلظت آنزیم و سوبسترا ارتباط دارد و با معادله میکائیلیس - منتن شرح داده می‌شود که در آن اصطلاح K_m با نحوه اتصال سوبسترا به آنزیم در ارتباط است. اصطلاح کینتیکی دیگر، یعنی **kcat**، نشان می‌دهد که آنزیم با چه سرعتی سوبسترا را به محصول تبدیل می‌کند.
- ترکیبات شیمیایی مختلفی مانع اتصال سوبسترا شده و سرعت کاتالیز را کاهش می‌دهند. بسیاری از داروها، مهارکننده‌های آنزیمی هستند که به جایگاه اتصالی سوبسترا یا یک دومن متفاوت در پروتئین آنزیم اتصال می‌یابند.
- علاوه بر جایگاه‌های اتصال به سوبسترا و کوآنزیم بر روی آنزیم، برخی آنزیم‌ها جایگاه‌های اتصالی دیگری (جایگاه‌های آلوستریک) دارند که در هنگام اتصال یک ترکیب (لیگاند)، فعالیت کاتالیتیکی را تنظیم می‌کنند. این لیگاندها (تغییردهنده‌ها یا افکتورهای آلوستریک) معمولاً سبب القاء تغییری در ساختمان آنزیم می‌شوند. خصوصیات کاتالیتیکی برخی آنزیم‌ها از طریق تغییر کووالان دستخوش تغییر می‌شود.
- آنزیم‌های اختصاصی - بافت که طی آسیب سلولی به داخل خون آزاد می‌شوند، برای ارزیابی وضعیت بالینی اندازه‌گیری می‌شوند. آنزیم‌ها همچنین در درمان برخی حالات پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۱۰-۱ • مقدمه

آنزیم‌ها پروتئین‌های تخصص‌یافته‌ای هستند که واکنش‌های بیولوژیکی را کاتالیز می‌کنند. حقیقتاً هر واکنشی که در داخل یک سلول رخ می‌دهد، نیاز به فعالیت یک آنزیم دارد، زیرا اکثر واکنش‌ها تحت شرایط (**pH**، درجه حرارت، و محیط یونی) فیزیولوژیک سلول با یک سرعت قابل جستجو انجام نمی‌شوند. آنزیم‌ها کاتالیست‌های کارآمدی نه تنها برای افزایش سرعت تبدیل سوبسترا به محصول، بلکه همچنین تشخیص یک ساختمان شیمیایی اختصاصی در حضور ساختمان‌های مشابه برای تولید یک محصول اختصاصی هستند.

هرچند، تمامی کاتالیست‌های بیولوژیک آنزیم نیستند. ملکول‌های **RNA** کاتالیتیک (ص ۹۷) مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که در فرایند پردازش اینترون‌ها و **tRNA** شرکت می‌کنند، در حالی‌که ملکول‌های دیگر یک مرحله خود- پردازشی را از طریق هیدرولیز یک پیوند فسفودی‌استری در داخل زنجیر پلی‌پپتیدی خود انجام می‌دهند. آنزیم‌های ساختگی، تحت عنوان **آبزیم‌ها**، با تولید آنتی‌بادی‌هایی بر علیه مواد شیمیایی که آنالوگ‌های حالت - انتقالی هستند، تولید شده‌اند. آبزیم‌ها برای کاتالیز بیش از ۱۰۰ واکنش شیمیایی مختلف طراحی شده‌اند.

۲-۱۰ • طبقه‌بندی آنزیم‌ها

با پیشرفت حاصل در توالی‌های ژنومیکی، آنزیم‌های زیادی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. در اواسط سال ۲۰۰۴ اطلاعات مربوط به ۸۳,۰۰۰ آنزیم مختلف از ۹۸۰۰ موجود زنده متفاوت در دسترس قرار داشت؛ تا سال ۲۰۰۸ این تعداد دوبرابر شد. طبقه‌بندی آنزیم‌ها به شکلی است که تمامی آنها در یکی از شش کلاسی قرار می‌گیرند که براساس واکنش شیمیایی مشخص می‌گردد که این آنزیم‌ها کاتالیز می‌کنند. یک سیستم شماره‌گذاری، شامل چهار عدد برای هر آنزیم، توسط اتحادیه بین‌المللی بیوشیمی و بیولوژی ملکولی[1] (IUBMB) برای مشخص‌سازی هر آنزیم ابداع شده است. عدد اول نوع واکنشی را مشخص می‌کند که کاتالیز می‌گردد و به‌دنبال آن اعدادی آورده می‌شود که جزئیات واکنش را مشخص می‌کنند. جالب است که تمامی شیمی حیات را می‌توان در شش نوع مختلف واکنش‌های شیمیایی در نظر گرفت. کلاس‌های آنزیمی در جدول ۱-۱۰ فهرست شده‌اند.

نام‌های سیستماتیک آنزیم‌ها شامل سوبسترا و نوع واکنش می‌باشند؛ نام آنزیم اغلب به «از» ختم می‌شود. عدد IUBMB الکل دهیدروژناز که یک الکل را به یک آلدئید اکسیده

جدول ۱-۱۰ • خلاصه‌ای از کلاس‌های آنزیمی و زیرکلاس‌های اصلی

1. Oxidoreductases	2. Transferases
Dehydrogenases	Transaldolase
Oxidases	and transketolase
Reductases	Acyl, methyl
Peroxidases	glucosyl, and
Catalase	phosphoryltransferases
Oxygenases	Kinases
Hydroxylases	Phosphomutases
3. Hydrolases	4. Lyases
Esterases	Decarboxylases
Glycosidases	Aldolases
Peptidases	Hydratases
Phosphatases	Dehydratases
Thiolases	Synthases
Phospholipases	Lyases
Amidases	6. Ligases
Deaminases	Synthetases
Ribonucleases	Carboxylases
5. Isomerases	
Racemases	
Epimerases	
Isomerases	
Mutases (not all)	

1. International Union of Biochemistery and Molecular Biology

می‌کند، به صورت ۱.۱.۱.۱ می‌باشد. این نشان می‌دهد (۱) آنزیم مربوطه در واکنش اکسید-اسیون-احیاء شرکت دارد (عدد اول)، (۲) هیدروژن را به صورت یون هیدرید به کمک NAD^+ به عنوان پذیرنده الکترون (عدد دوم) برداشت می‌کند، و (۳) سوبستراهای این آنزیم می‌توانند اکثر الکل‌های اول (عدد سوم) باشند. (۴) آخرین عدد برای تمایز هر کدام از آنزیم‌هایی است که همین واکنش کلی را بر روی سوبستراهای مختلف کاتالیز می‌کنند. لاکتات دهیدروژناز (۱.۱.۱.۲۷) واکنش یکسانی را به عنوان الکل دهیدروژناز کاتالیز می‌کند، ولی سوبسترای آن لاکتات است. آنزیم‌ها اغلب در جهت واکنشی نامگذاری می‌شوند که در سلول مهم است.

گاهی برای آنزیم‌ها از نام‌های ساختگی استفاده می‌شود، برای مثال به آنزیمی که یک واکنش کندانسیون آلدول را بین گلیسرآلدئید ۳-فسفات و دی‌هیدروکسی‌استن فسفات کاتالیز می‌کند، نام آلدولاز داده شده و همچنان از این نام استفاده می‌شود (ص. ۸۰۷)، به همین ترتیب نام لیزوزیم برای آنزیمی در نظر گرفته شد که دیواره سلول باکتری را تجزیه می‌کند. تلاش‌هایی انجام شده است تا برای بسیاری از آنزیم‌ها از نام سیستماتیک به‌جای نام غیرعلمی[1] استفاده شود، ولی در نوشتجات همچنان از هر دو نام برای بسیاری از آنزیم‌ها استفاده می‌شود.

ایزوزیم‌ها اشکال ساختمانی متفاوت یک پروتئین هستند که یک واکنش را کاتالیز می‌کنند. اینها محصول ژن‌های مختلف هستند، درجات متفاوتی از یکسانی توالی را دارند و خصوصیات کینتیکی آنها متفاوت است. دو ایزوزیم برای لاکتات دهیدروژناز، یکی شکل قلبی (H) و دیگری شکل عضلانی (M)، وجود دارد توالی‌های اسید آمینه‌ای آنها قدری متفاوت است و می‌توانند پنج ساختمان تترامری متفاوت به‌وجود آورند (جدول ۲-۱۰).

کلاس ۱: اکسیدوردوکتازها

کلاس ۱ آنزیم‌ها واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء را کاتالیز می‌کنند و تحت عنوان اکسیدوردوکتازها مورد اشاره قرار می‌گیرند. اکسیداسیون به معنی از دست دادن الکترون و احیاء به معنی دریافت الکترون است. الکترون‌ها از سوبسترایی برداشت می‌شوند که اکسیده

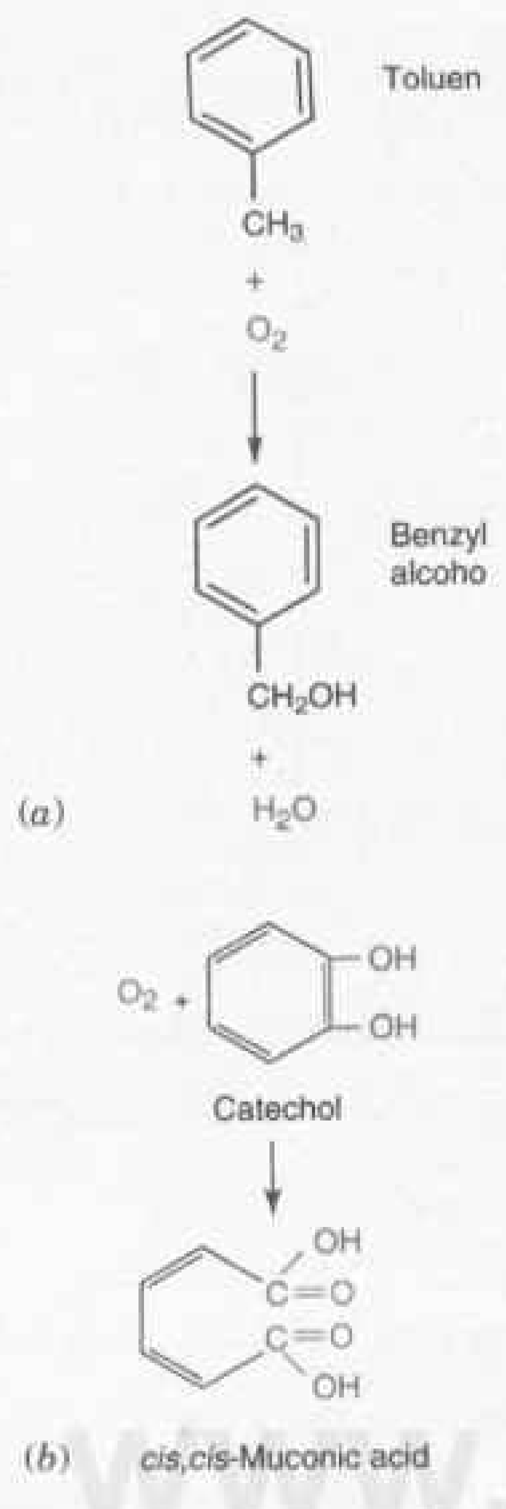
جدول ۲-۱۰ • ایزوزیم‌های لاکتات دهیدروژناز

نوع	ترکیب	موقعیت
LDH_1	HHHH	میوکارد و RBC
LDH_2	HHHM	میوکارد و RBC
LDH_3	HHMM	مغز و کلیه
LDH_4	HMMM	
LDH_5	MMMM	کبد و عضله اسکلتی

1. Trivial

می‌گردد (دهنده[1] یا احیاءکننده[2]) و به سوبسترای دومی اضافه می‌گردند که احیاء می‌شود (پذیرنده[3] یا اکسیدکننده[4]). پذیرنده‌های الکترونی مختلف زیادی در سیستم‌های بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (ص ۷۵۹). دهیدروژنازها معمولاً در جهت اکسیداسیون نامگذاری می‌شوند. مثال‌ها شامل لاکتات دهیدروژناز به جای پیرووات ردوکتاز و گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز به‌جای ۳،۱-بیس‌فسفوگلیسرات ردوکتاز می‌باشند.

واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء شامل جفت‌های دهنده-پذیرنده زیر هستند: پیوندهای کربن-کربن اشباع-غیراشباع، الکل‌ها-آلدئیدها، آلدئیدها-اسیدها، و آمین‌ها-ایمین‌ها. اکسیژن ملکولی (O_2) به عنوان یک پذیرنده الکترون در انواع مختلفی از واکنش‌های اکسید-اسیون-احیاء برگشت‌پذیر نقش دارند. منواکسیژنازها قرارگیری یک گروه هیدروکسی در داخل سوبسترا را کاتالیز می‌کنند و اتم دیگر اکسیژن به آب تبدیل می‌شود (شکل ۱-۱۰)، در حالی‌که دی‌اکسیژنازها هر دو اتم O_2 را در داخل یک سوبسترا قرار می‌دهند. سیتوکروم‌های P450 (ص ۵۷۷) گروه مهمی از آنزیم‌هایی هستند که از اکسیژن در متابولیسم گزنوبیوتیک‌هایی نظیر داروها و سموم استفاده می‌کنند؛ این آنزیم‌ها یک ترکیب اشباع‌شده را به یک الکل تبدیل می‌کنند؛ در واکنش هیدروکسیلاسیون از یکی از اتم‌های O_2 برای گروه هیدروکسیل استفاده می‌شود.

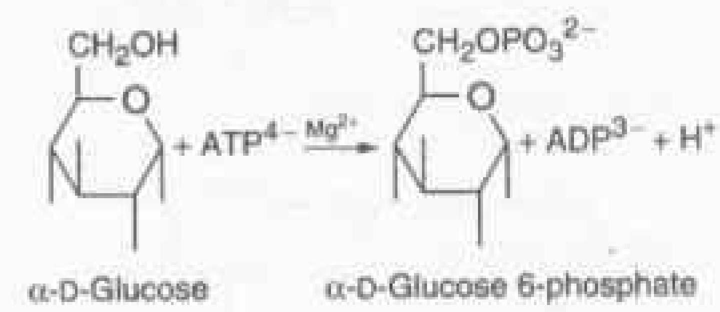


شکل ۱-۱۰ **واکنش‌های اکسیداسیون آنزیمی.** هیدرو-کسیلاسیون تولوئن، یک حلال صنعتی، و اکسیژناسیون کاتکول توسط یک اکسیژناز.

کلاس ۲ : ترانسفرازها

اعضاء این خانواده بزرگ، یک گروه شیمیایی را از یک ملکول به ملکول دیگر انتقال می‌دهند؛ لذا دو سوبسترا دارند و دو محصول تولید می‌کنند. هگزوکیناز یک گروه فسفات را از ATP به پذیرنده‌ای نظیر گلوکز انتقال می‌دهد (شکل ۲-۱۰). آنزیمی که فسفات را با استفاده از یک نوکلئوزید تری‌فسفات به عنوان دهنده به ملکول دیگر انتقال می‌دهد، کیناز نامیده می‌شود؛ پذیرنده می‌تواند یک ملکول کوچک و یا یک پروتئین باشد. استیل‌ترانسفراز مثال دیگری از ترانسفرازها است که انتقال یک گروه استیل را از استیل کوآ به پذیرنده‌ای نظیر لیزین موجود در یک هیستون یا یک سرین موجود در سایر پروتئین‌ها انتقال می‌دهد (شکل ۳-۱۰).

یکی از واکنش‌های مهم انتقال آمین، بین یک اسید آمینه و یک ترکیب حاوی کربن صورت می‌گیرد. این آنزیم‌ها، **آمینوترانسفرازها**، یک گروه آمینو را انتقال داده و اسید آمینه را به یک کتو اسید تبدیل می‌کنند؛ سوبسترای پذیرنده، یک کتو اسید، به یک اسید آمینه تغییر می‌یابد (شکل ۴-۱۰). آمینوترانسفرازها برای فعالیت نیاز به پیریدوکسال فسفات به‌عنوان کوآنزیم دارند که از ویتامین B_6 مشتق می‌شود (ص ۱۰۱۲).

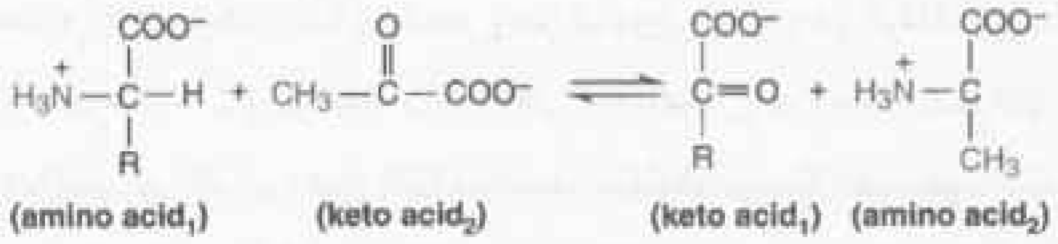


شکل ۲-۱۰ **واکنش فسفریلاسیون.** فسفریلاسیون گلوکز به کمک ATP که توسط هگزوکیناز کاتالیز می‌شود.

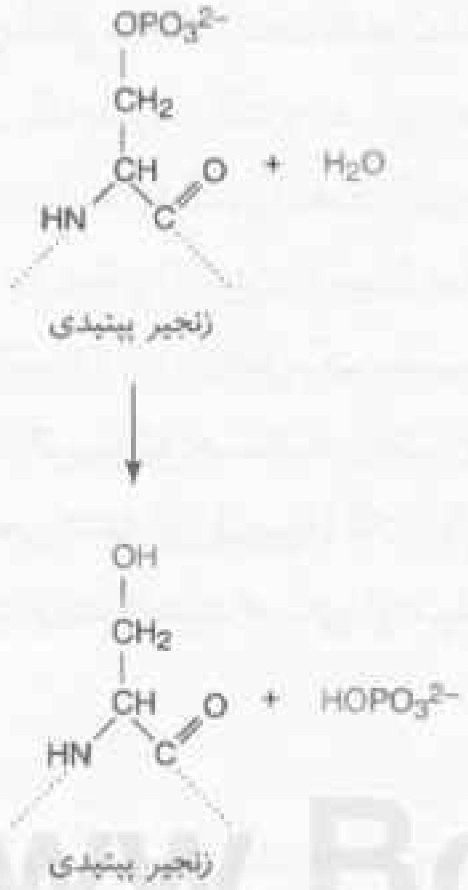
کلاس ۳: هیدرولازها

هیدرولازها واکنش‌های هیدرولیز را کاتالیز می‌کنند که افزودن آب به یک پیوند شیمیایی

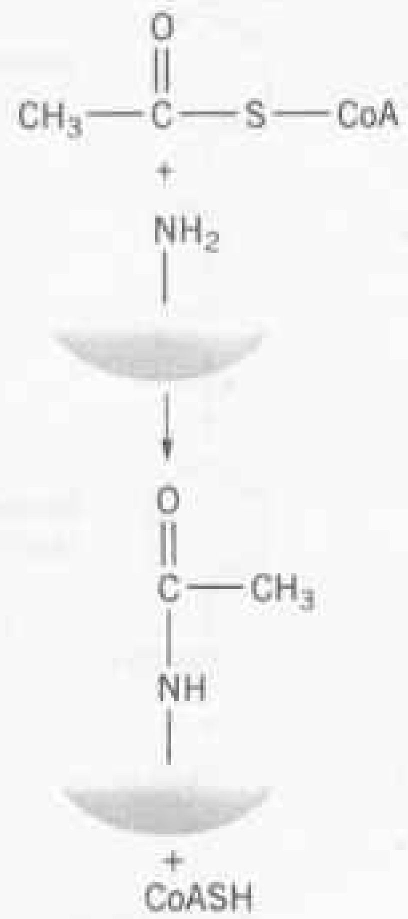
1. Donor 2. Reductant 3. Acceptor 4. Oxidant



شکل ۴-۱۰ مثالی از واکنشی که توسط یک آمینوترانسفراز کاتالیز می‌شود. واکنش‌های آمینوترانسفراز نیاز به پیریدوکسال فسفات (PLP) دارند.



شکل ۵-۱۰ هیدرولیز یک پروتئین فسفریله توسط یک پروتئین فسفاتاز.

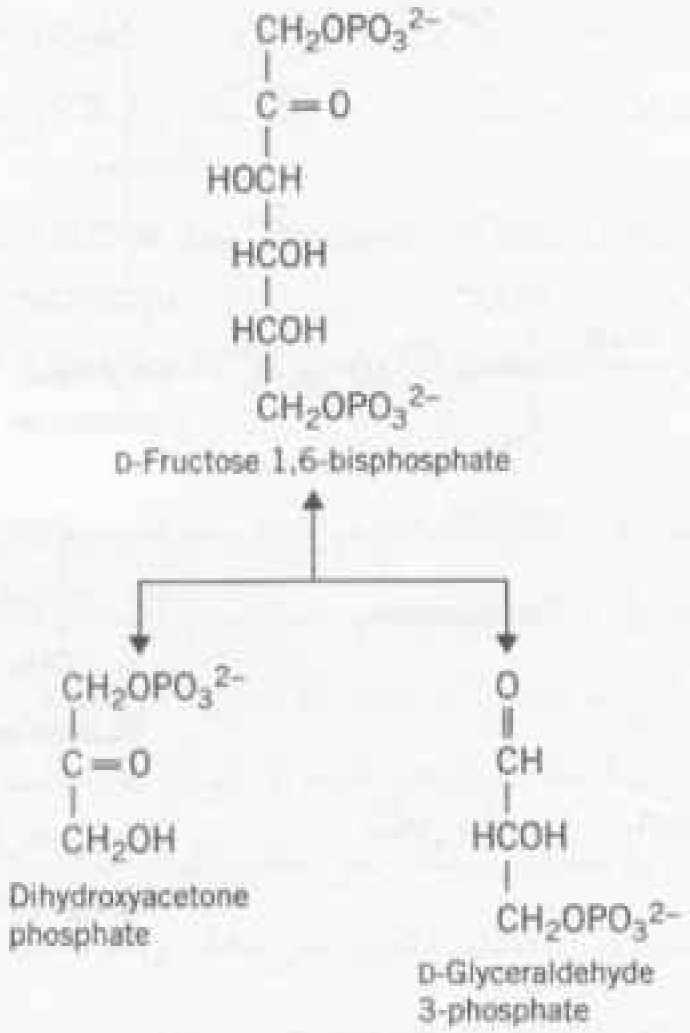


شکل ۳-۱۰ استیلاسیون ریشه‌های اسید آمینه موجود در یک پروتئین.

است (شکل ۵-۱۰). این واکنش اساساً نوعی انتقال OH− از آب به سوبسترا است، ولی آنزیم‌های مربوطه تحت عنوان ترانسفرازها طبقه‌بندی نمی‌شوند. هیدرولیز اساساً یک واکنش غیرقابل برگشت است. سوبسترا معمولاً یک استر یا یک آمید، برای مثال استر بین الکل و یک اسید کربوکسیلیک، است. هیدرولیز استر کلسترول در جهت تولید کلسترول و یک اسید چرب، نمونه‌ای از این واکنش‌ها است. لزومی ندارد که اسید یک اسید کربوکسیلیک باشد؛ اسید سولفوریک، اسید فسفریک، یا هر اسید دیگری می‌تواند یک پیوند استری به وجود آورد. RNAseها و DNAseها آنزیم‌هایی هستند که پیوند فسفو-استری را می‌شکنند. کاربرد بالینی یک هیدرولاز در ارتباط بالینی ۱-۱۰ آورده شده است.

کلاس ٤: لیازها

لیاز اشاره به شکستن دارد. این آنزیم‌ها معمولاً پیوند کربن-کربن را می‌شکنند. آنزیم‌های دیگر موجود در این کلاس می‌توانند یک پیوند کربن-نیتروژن را تولید کرده و یا بشکنند یا یک CO_2 را از یک β-کتو اسید آزاد کنند. برخی از این واکنش‌ها قابل‌برگشت هستند، لذا همان‌طور که در مورد واکنش آلدولاز نشان داده شده است (شکل ۶-۱۰)، امکان تولید



شکل ۶-۱۰ واکنش لیاز که توسط آلدولاز کاتالیز می‌شود.

پیوند کربن-کربن وجود دارد. برخی لیازها نیاز به پیریدوکسال فسفات به عنوان کوفاکتور دارند. واکنش‌های نوروشیمیایی مهم نظیر تولید دوپامین (شکل ۷-۱۰) و سروتونین، نمونه‌هایی از این نوع واکنش‌ها هستند. در صورتی که یک نوکلئوزید تری‌فسفات در تولید پیوند جدید نقش نداشته باشد، آنزیم را یک سنتاز گویند، ولی در صورت نیاز به آزادسازی انرژی در هنگام هیدرولیز ATP، آنزیم را **سنتتاز** گویند (کلاس ۶: لیگازها را ببینید).

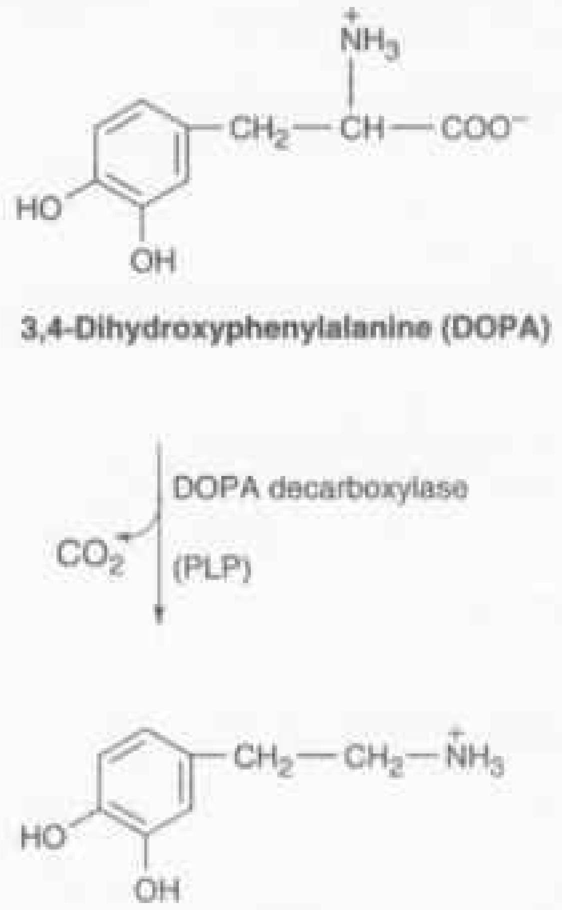
کلاس ۵: ایزومرازها

آنزیم‌های این کلاس در جابه‌جایی یک گروه یا یک پیوند دوگانه در داخل یک ملکول نقش دارند. این واکنش‌ها شامل جابه‌جایی موقعیت یک گروه هیدروکسیل و یک گروه کربونیل می‌باشند، مثل حالتی که در زمان تبدیل گلوکز ۶-فسفات به فروکتوز ۶-فسفات (ص ۸۰۸)، و جابه جایی یک پیوند دوگانه از یک موقعیت به موقعیت مجاور مثلاً در هنگام متابولیسم اسیدهای چرب (ص ۹۳۷)، مشاهده می‌گردد. وقتی یک گروه فسفات از یک کربن به کربن دیگری در داخل همان ملکول انتقال داده می‌شود، آنزیم را موتاز گویند؛ مثل تبدیل ۲-فسفوگلیسرات به ۳-فسفوگلیسرات که توسط فسفوگلیسرات موتاز کاتالیز می‌گردد (شکل ۸-۱۰). ایزومرازها و اپیمرازها ممکن است شیمی فضایی را در اتم کربن تغییر دهند. تبدیل D-لاکتات به L-لاکتات مثالی از یک واکنش ایزومرازی است و تبدیل D-گزیلوز ۵-فسفات به D-ریبولوز ۵-فسفات مثالی از یک واکنش اپیمرازی می‌باشد (شکل ۹-۱۰). واکنش UDP-گلوکز ۴-اپیمراز نیاز به NAD دارد، به همین

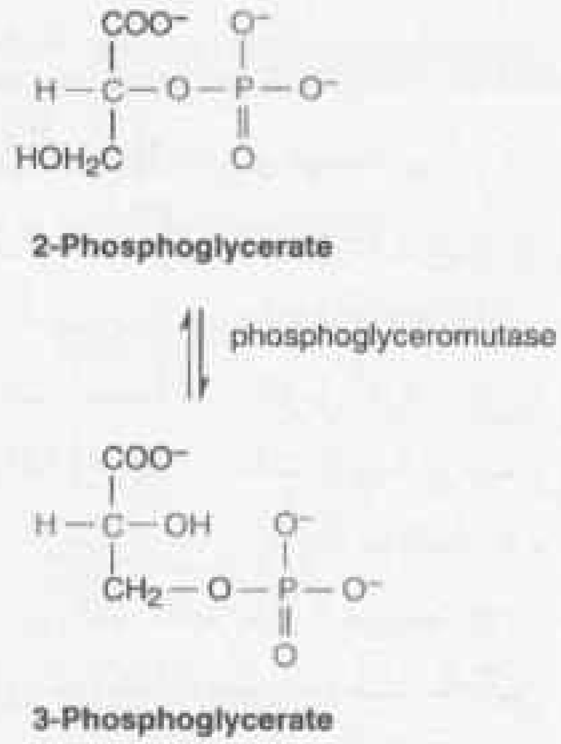
ارتباط بالینی ۱-۱۰

هیدرولیز آسپاراژیناز و لوسمی

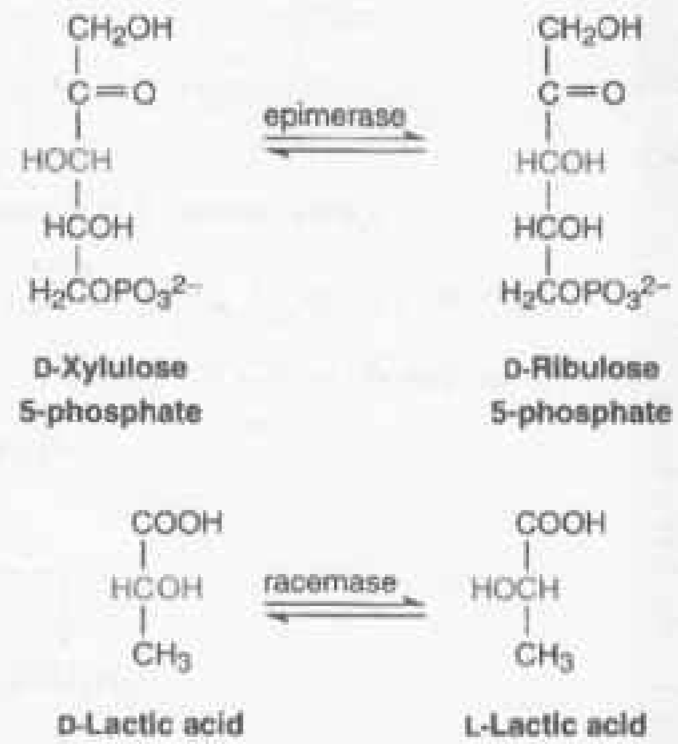
برخی اشکال لوسمی نیاز به اسید آمینه غیرضروری آسپاراژین دارند. محققین ابتدایی آسپاراژیناز باکتریایی، یک هیدرولاز که تبدیل آسپاراژین به آسپارتات را کاتالیز می‌کند، را ثابت نمودند و سپس خون بیمار را از ستون حاوی این آنزیم ثابت‌شده عبور دادند. این عمل منجر به فروکش بیماری در مبتلایان به لوسمی لنفوبلاستی حاد شد. محققین بعدی دریافتند که آنها می‌توانند این آنزیم را به بیمار تزریق کنند تا سوبسترای موجود در گردش خون را هیدرولیز نماید. اخیراً این آنزیم بر روی پلی اتیلن‌گلیکول کد شده است، زیرا علی‌رغم تخلیص کامل آنزیم باکتریایی تا مرحله هُموژنیتی کامل، برخی بیماران به این آنزیم واکنش نشان دادند. آنزیم کد شده به‌خوبی در کودکان عمل کرده است و سبب برداشت آسپاراژین خون شده است. این شکل آنزیم به‌طور تجارتی در دسترس قرار دارد و برای درمان انسانی به تأیید رسیده است.



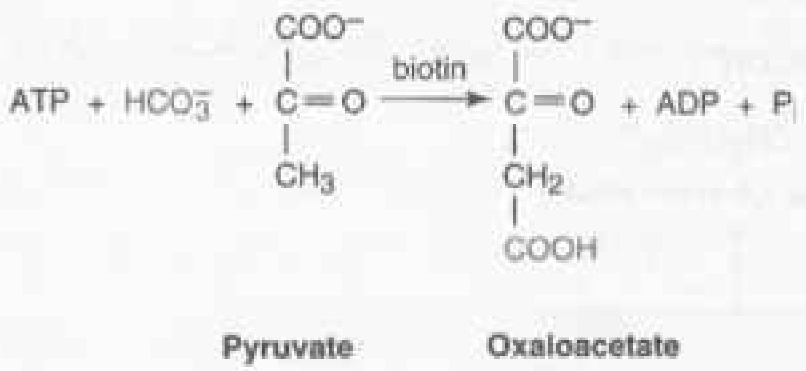
شکل ۷-۱۰ سنتز دوپامین مستلزم یک واکنش لیازی است. سنتز دوپامین نیاز به پیریدوکسال فسفات (PLP) دارد.



شکل ۱۰-۸ تبدیل متقابل ۲- و ۳- فسفوگلیسرات.



شکل ۱۰-۹ مثال‌هایی از واکنش‌هایی که توسط یک اپیمراز و یک راسماز کاتالیز می‌شوند.



شکل ۱۰-۱۰ واکنش پیرووات کربوکسیلاز.

دلیل تصور می‌رود که طی این واکنش یک واکنش اکسیداسیون- احیاء رخ می‌دهد، ولی اکسیداسیون- احیاء خالص کوآنزیم صورت نمی‌گیرد.

کلاس ۶: لیگازها

لیگازها دو اتم کربن را به یکدیگر متصل می‌کنند، ولی برخلاف لیازها، کلاس ۴، برای انجام واکنش نیاز به انرژی دارند. اینها را **سنتتاز** گویند. به‌طور شاخص، انرژی با همکاری ATP تأمین می‌شود. برای مثال، برای افزودن CO_2 به پیرووات، CO_2 در داخل کوآنزیم بیوتین قرار داده می‌شود که خود نیاز به هیدرولیز ATP دارد (شکل ۱۰-۱۰). این CO_2 توسط همان آنزیم به پیرووات منتقل می‌گردد. افزودن یک اسید آمینه به tRNA مثال دیگری از آنزیم‌های این کلاس است (ص ۲۹۴). لازم است تا حدودی تعامل بین اجزاء واکنش برای مصرف انرژی آزادشده از هیدرولیز ATP جهت سنتز پیوند جدید وجود داشته باشد.

۱۰-۳ • مفاهیم عمومی مکانیسم آنزیمی

ملاحظات ترمودینامیکی

برای تولید مواد شروع‌کننده یک واکنش و برای تولید محصولات یک واکنش نیاز به انرژی است. این انرژی را **گرمای تولید**[1] گویند. یک **ارتباط ترمودینامیکی** بین تفاوت در انرژی مورد نیاز برای تولید مواد شروع‌کننده (واکنشگرها[2]) و تولید محصولات[3] وجود دارد. تفاوت انرژی $\Delta G°$، و واحدها را می‌توان برحسب کیلوژول در مول (kJ/mol) یا کیلوکالری

1. Heats of production 2. Reactants 3. Products

بر مول (kacl/mol) بیان نمود (یک نگاه دقیق‌تر ۱-۱۰). در حالت تعادل واکنش، غلظت هر کدام از مواد طبق معادله ۱-۱۰ با یکدیگر مرتبط می‌شوند.

$$\Delta G_0 = -2.3RT \times \log[\text{Products}]/[\text{Reactants}] \qquad (۱۰-۱)$$

R ثابت عمومی گازها (۸٫۳۱ J/mol/°K یا ۱٫۹۹ cal/mol/°K) و T درجه حرارت برحسب °K می‌باشد.

وقتی یک کاتالیست به واکنش اضافه می‌شود، سرعت واکنش را افزایش می‌دهد تا مواد شروع‌کننده و محصول به تعادل برسند. نسبت [واکنشگرها]/[محصولات] ثابت تعادل، K_{eq}، می‌باشد. این به معنی آن است که تفاوت موجود در بین انرژی آزاد (گرمای تولید) محصولات و واکنشگرها، میزان هر کدام از آنها را در حالت تعادل نشان می‌دهد. این ثابت، سرعت رسیدن به تعادل را نشان نمی‌دهد. یک کاتالیست سرعت واکنش رسیدن به تعادل را افزایش می‌دهد، ولی تعادل را تغییر نمی‌دهد. K_{eq} توسط گرمای تولید مشخص می‌گردد که میزان آن در هر واکنشی ثابت است.

بسیاری از واکنش‌ها قابل برگشت در نظر گرفته می‌شوند؛ تبدیل محصولات واکنش‌های غیرقابل برگشت به مواد شروع‌کننده، حتی در حضور آنزیم، غیر ممکن است، زیرا اساساً ۱۰۰٪ مواد شروع‌کننده، به محصول تبدیل خواهد شد. این گفته کاملاً صادق نیست، زیرا برای واکنش‌هایی که اساساً غیرقابل برگشت هستند، نسبت مواد شروع‌کننده به محصولات ممکن است ۱:۲۰۰,۰۰۰ یا حتی ۱:۱,۰۰۰,۰۰۰ باشد. این واکنش به تعادل می‌رسد، ولی میزان مواد شروع‌کننده موجود در حالت تعادل کمتر از میزان قابل جستجو است، لذا واکنش اساساً غیرقابل‌برگشت در نظر گرفته می‌شود.

یک نگاه دقیق‌تر ۱-۱۰

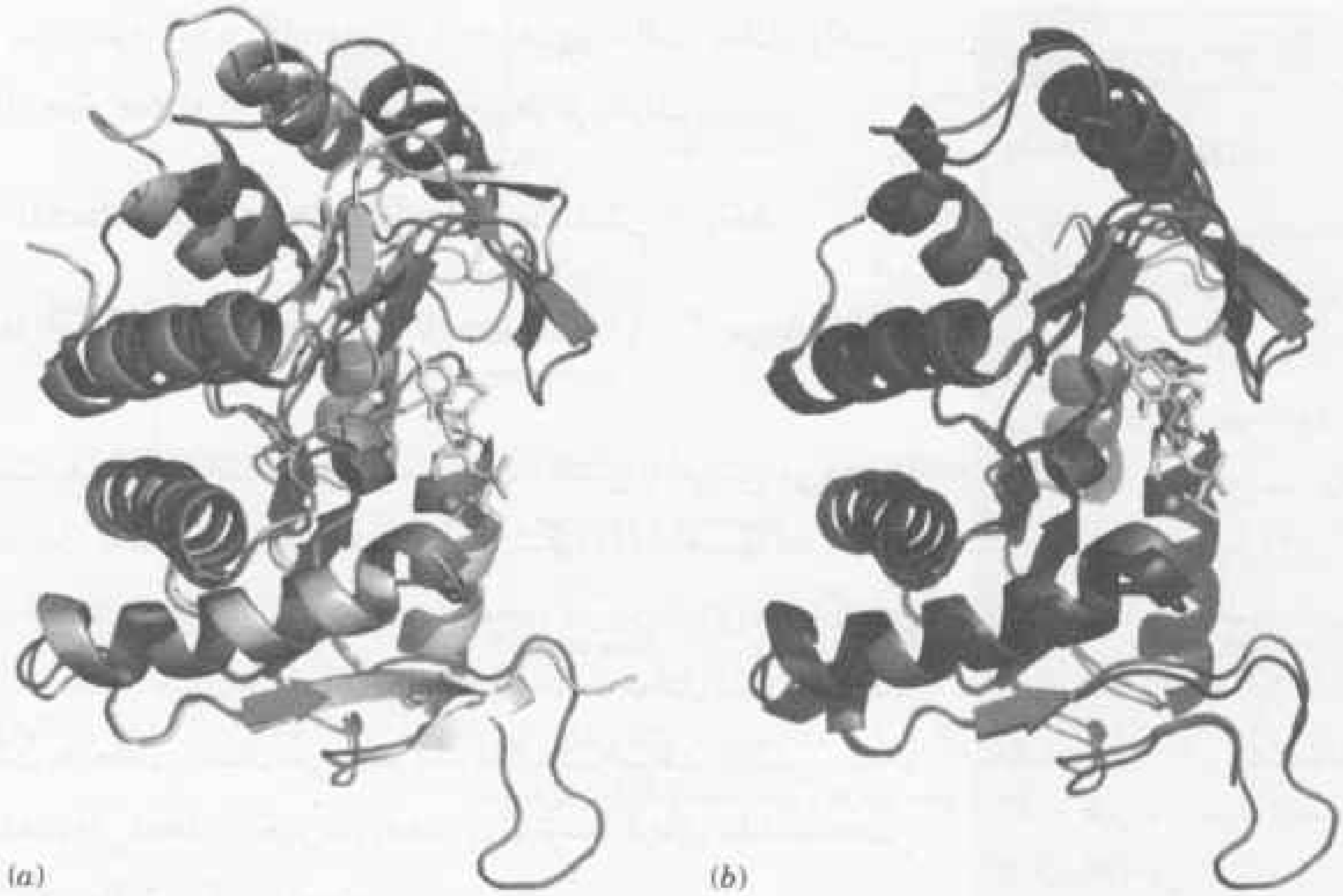
واحدهای انرژی

دو واحد متفاوت برای بیان واحدهای مربوط به انرژی آزادشده یا مورد نیاز برای یک واکنش شیمیایی وجود دارد. یکی کالری و دیگری ژول که هم اکنون مورد اخیر در نوشتجات علمی بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. از کالری همچنان برای اشاره به میزان انرژی موجود در مواد غذایی استفاده می‌شود. برای مثال، یک لیوان معمول آبجو در صورت متابولیزه شدن، حاوی تقریباً ۱۲۵ Cal (۱۲۵ kilocal) است. برای تبدیل واحد کالری به ژول، میزان کالری در ۴٫۱۸۴ ضرب می‌شود. برهمین اساس، ثابت عمومی گازها (R) در معادله ۱-۱۰ برابر ۱٫۹۸۷ cal/mol/°K یا ۸٫۳۱ J/mol°K می‌باشد. در این کتاب از کیلوژول (kJ) برای بیان انرژتیک تغییرات بیو-لوژیکی استفاده می‌شود، ولی مقادیر براساس کیلو کالری (kcal یا Cal) نیز آورده می‌شوند. در بحث‌های تغذیه‌ای از کالری (Cal) استفاده می‌شود.

اتصال سوبسترا به آنزیم

برای آنزیمی که به عنوان یک کاتالیست عمل می‌کند، لازم است ابتدا به سوبسترا(ها) اتصال یابد و سپس انرژی فعال‌سازی را کاهش دهد تا واکنش با سرعت بیشتری نسبت به حالت عدم وجود کاتالیست انجام شود. برای نحوه اتصال سوبسترا به آنزیم، دو تئوری معمول وجود دارد. تئوری کلاسیک **تئوری قفل و کلید**[1] می‌باشد که براساس آن جایگاه اتصالی سوبسترا یک آنزیم یک محل سخت است و تنها ترکیبی با یک شکل خاص منطبق با آن می‌باشد؛ این حالت همانند قفلی (آنزیمی) است که اجازه می‌دهد تا یک کلید (سوبسترا) با آن تماس مناسب برقرار کند. تئوری دیگر **تئوری قالب- القاءشده**[2] می‌باشد. طبق این تئوری، آنزیم انعطاف‌پذیر است و بعد از اتصال سوبسترا به آنزیم، کونفورماسیون این پروتئین طوری تغییر می‌یابد که یک کمپلکس دوتایی پایدار به وجود آید. هر دوی این تئوری‌ها قبل از شناخت ساختمان واقعی هر نوع پروتئینی ارائه شدند. هم اکنون که ساختمان سه-بُعدی

1. Lock-and-key
2. Induced-fit



شکل ۱۱-۱۰ اوروتات فسفوریبوزیل‌ترانسفراز. اوروتات فسفوریبوزیل‌ترانسفراز (OPRTase) ترکیب وابسته به Mg^{2+} اسید اوروتیک (OA) با PRPP (۵-α-فسفوریبوز ۱-دی‌فسفات) راکاتالیز می‌کند تا تولید پیروفسفات (PPi) و نوکلئوتید OMP (اوروتیدین ۵′-منوفسفات) شود. (a) آنزیم آزاد به رنگ cyan و کمپلکس سه‌تایی به رنگ آبی. (b) کمپلکس سه‌تایی به رنگ قرمز و کمپلکس دوتایی به رنگ آبی. برای واکنش‌های بیوسنتز پیریمیدین به صفحه ۱۰۹۴ مراجعه کنید.

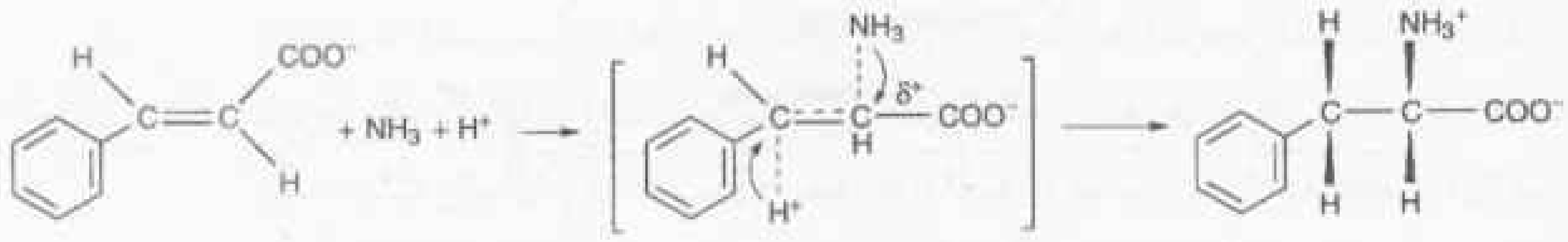
بسیاری از آنزیم‌ها شناخته‌شده می‌باشد، مشخص شده است که اتصال سوبسترا منجر به حرکت کوچک پیوندهای پپتیدی می‌شود که از فرضیه قالب-القاءشده حمایت می‌کند. در شکل ۳۳-۳ یک تغییر کونفورماسیونی بزرگ شرح داده شده است. شکل ۱۱-۱۰ تغییری را در کونفورماسیون نشان می‌دهد.

ساختمان تغییریافته یک آنزیم بعد از اتصال یک سوبسترا، امکان رخداد تعاملات مکمل بین سوبسترا و آنزیم را فراهم می‌سازد. این به معنی آن است که یک قسمت آبدوست سوبسترا در نزدیکی اسیدهای آمینه‌ای قرار می‌گیرد که امکان ایجاد یک پیوند هیدروژنی را فراهم می‌سازد، و یک قسمت باردار سوبسترا طوری تعامل می‌کند که یا بار آن توسط یک بار مخالف خنثی می‌شود و یا با ایجاد یک پیوند هیدروژنی تثبیت می‌گردد. قسمت‌های آبگریز سوبسترا طوری اتصال می‌یابند که در قسمت آبگریزی از پروتئین، به‌نام **پاکت آبگریز**[1]، قرار گیرند.

حالت انتقالی

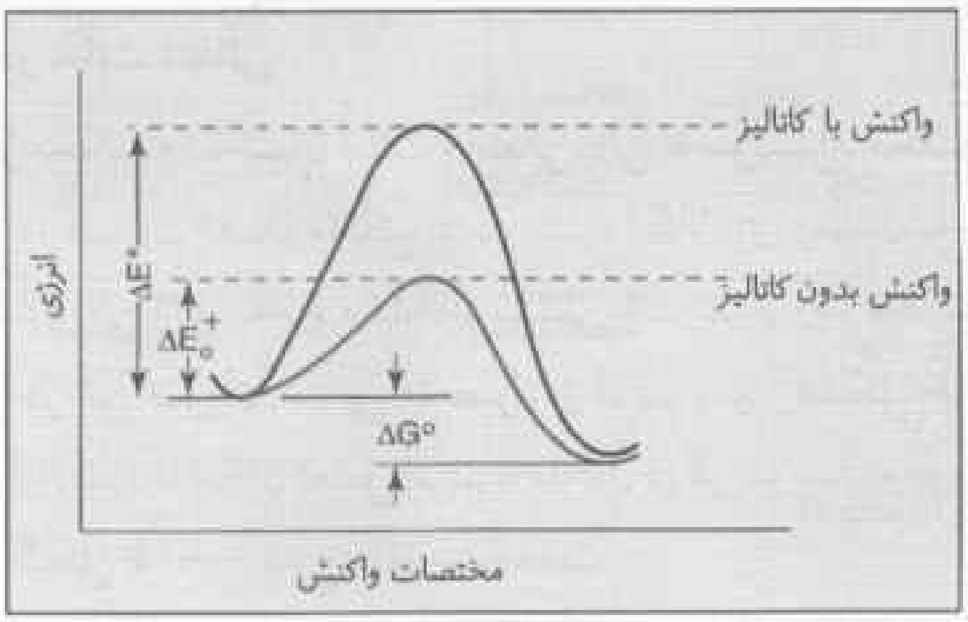
تئوری تشریح نحوه انجام یک واکنش شیمیایی براساس مدل حالت انتقالی[2] می‌باشد. مفهوم پایه این است که ماده شروع‌کننده (سوبسترا) خصوصیات ساختمانی و شیمیایی خاصی دارد و محصول خصوصیات دیگری دارد. حالت انتقالی ساختمانی است که در آن پیوندها

1. Hydrophobic pocket 2. Transition state

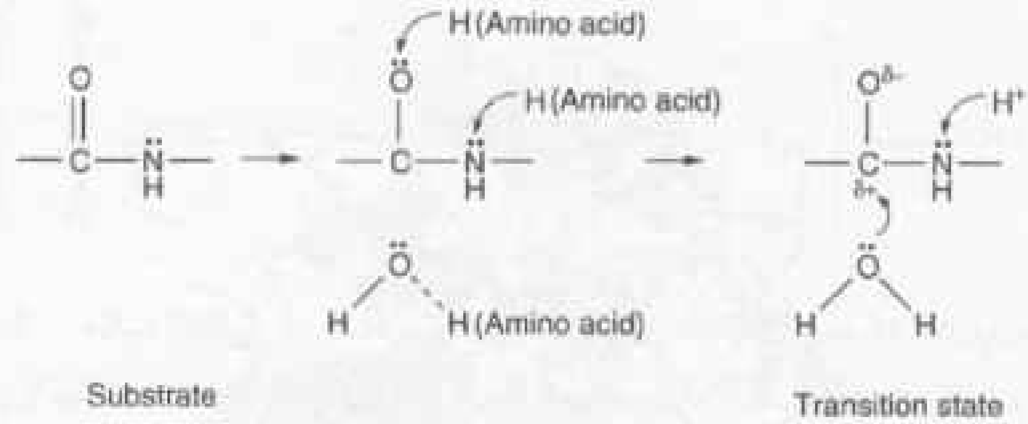


شکل ۱۲-۱۰ حالت انتقالی. این ساختمان حالت-انتقالی نشان می‌دهد که الکترون‌های موجود در پیوند دوگانه جابه‌جا شده تا پروتون ورودی را جا دهند، که کربن دیگر را مثبت می‌کند طوری‌که الکترون‌های موجود بر روی نیتروژن می‌توانند به آن حمله کنند.

طوری در حال تغییر هستند که نه مثل ماده شروع‌کننده و نه مثل محصول می‌باشند. این حالت را می‌توان در واکنش افزودن آمونیاک به اسید ترانس-سینامیک در جهت تولید فنیل‌آلانین تشریح نمود (شکل ۱۲-۱۰) که در آن پیوند دوگانه موجود در ماده شروع‌کننده مسطح است. محصول حاوی گروه آمینی است که به شکلی به کربنی اتصال یافته است که قبلاً قسمتی از پیوند دوگانه (مسطح) بوده و حالا یک ساختمان چهاروجهی دارد. این حالت انتقالی جایی است که در آن پیوند در حال تولید و هندسه در حال تغییر می‌باشد. تغییر شکل سوبسترا نیاز به انرژی دارد، لذا مشابه حالت انتقالی است و سرعت یک واکنش نسبت عکس با انرژی مورد نیاز برای رسیدن به حالت انتقالی دارد. نمودار انرژی واکنش در شکل ۱۳-۱۰ آورده شده است و از آن برای تشریح تغییر انرژی مورد نیاز برای تبدیل سوبسترا به حالت انتقالی استفاده می‌شود. در حالت انتقالی، موجودیتی وجود دارد که هرگز مشاهده یا جدا نشده است. موجودیت حالت-انتقالی می‌تواند به سمت تولید محصول پیشرفت نموده و یا می‌تواند به سمت ماده شروع‌کننده برگردد. یک کاتالیست به راحتی انرژی حالت انتقالی (ΔE°) را پایین می‌آورد و بنابراین سرعت تولید آن را از ماده شروع‌کننده افزایش می‌دهد، لذا سرعت واکنش را بالا می‌برد. این عمل به‌واسطه وجود ریشه‌هایی در آنزیم به انجام می‌رسد که با سوبسترا در حالت انتقالی تعامل می‌کنند.



شکل ۱۳-۱۰ دیاگرام‌های انرژی برای واکنش‌های کاتالیزشده و کاتالیزنشده. نمایش دیاگرامی تفاوت در انرژی بین واکنشگر و محصول. وضعیت پایه توسط ΔG_0 و وضعیت انتقالی توسط ΔE^{*} نشان داده می‌شود. سرعت واکنش نسبت عکس با ΔE^{*} دارد، در حالی‌که K_{eq} با تفاوت در ΔG_0 ارتباط دارد. ΔE^{*} انرژی مورد نیاز برای افزایش وضعیت پایه به وضعیت انتقالی فرضی است.



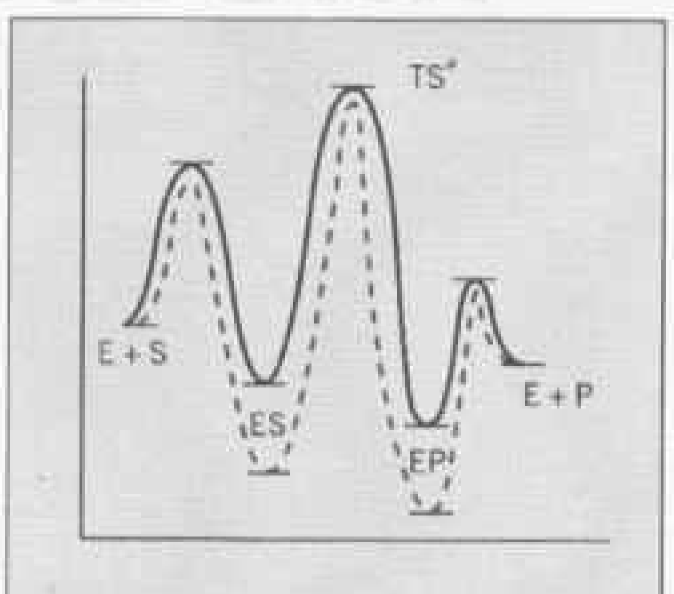
شکل ۱۴-۱۰ وضعیت انتقالی برای هیدرولیز یک پیوند پپتیدی. گروه کربونیل در پیوند پپتیدی مسطح با حمله آب (یا OH^-) و پروتونه‌شدن نیتروژن، چهاروجهی شده و در ادامه پیوند پپتیدی هیدرولیز می‌شود. اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال، یک H^+ برای تثبیت بار منفی در حال ایجاد بر روی اتم اکسیژن کربونیل می‌دهد، و نیتروژن را پروتونه می‌کند تا به شکل آمین خارج می‌شود. یک اسید آمینه متفاوت در پروتئین، یک پروتون را از آب برداشت نموده و OH^- واکنشگرتر را تولید می‌کند.

آنزیم با کاهش انرژی فعال‌سازی سبب تثبیت حالت انتقالی و بنابراین افزایش سرعت واکنش می‌شود. این عمل به‌واسطه تعامل ریشه‌هایی از آنزیم با سوبسترا در حالت انتقالی به انجام می‌رسد.

هیدرولیز یک پیوند پپتیدی برای تولید یک اسید کربوکسیلیک و یک گروه آمینوی آزاد، نشان می‌دهد که چطور امکان دارد آنزیم حالت انتقالی را تثبیت کند (شکل ۱۴-۱۰). با افزودن آب به پیوند پپتیدی، گروه کربوکسیل چهاروجهی شده و از اینرو می‌بایست زاویه پیوند و شکل خود را تغییر دهد. این حالت انتقالی ترکیب واسط چهاروجهی نیست، بلکه کونفورماسیونی است که برای تولید آن لازم است پیوند کووالان واقعی ایجاد شود. در طی واکنش نه تنها پیوند کربن-کربن گروه کربونیل موجود بر روی سوبسترا طی تبدیل حالت مسطح به حالت چهاروجهی تغییر می‌کند، بلکه یک بار منفی نیز بر روی اکسیژن بوجود می‌آید که نیاز به تثبیت دارد.

اتصال محکم در حالت انتقالی

یک آنزیم به‌طور محکم به ساختمان حالت-انتقالی، ولی نه سوبسترا یا محصولات انتهایی، اتصال می‌یابد. در صورت اتصال محکم به سوبسترا، آنگاه برای رسیدن به حالت انتقالی نیاز به انرژی بیشتری می‌باشد. به‌طور مشابه، آنزیم نمی‌تواند اتصال زیاد محکمی با محصول برقرار کند، زیرا در این صورت جدایی محصول از آنزیم بسیار مشکل خواهد بود. لازم است محصول آزاد شود تا امکان تعامل آنزیم با ملکول دیگر سوبسترا وجود داشته باشد. این مفاهیم در شکل ۱۵-۱۰ شرح داده شده است.



شکل ۱۵-۱۰ دیاگرام‌های انرژی برای وضعیت انتقالی سوبسترای با اتصال محکم. خط قرمز اتصال محکم سوبسترا در مقایسه با اتصال سُست‌تر سوبسترا را نشان می‌دهد. در صورت اتصال محکم سوبسترا، انرژی بیشتری مورد نیاز است، لذا واکنش رسیدن به حالت انتقالی آهسته‌تر می‌باشد. در صورتی‌که محصول اتصال محکم داشته باشد، وضعیت مشابهی رخ می‌دهد؛ انرژی بیشتری برای رسیدن به حالت انتقالی جهت آزادسازی محصول مورد نیاز خواهد بود. برای هر مرحله در واکنش، یک حالت انتقالی وجود دارد.

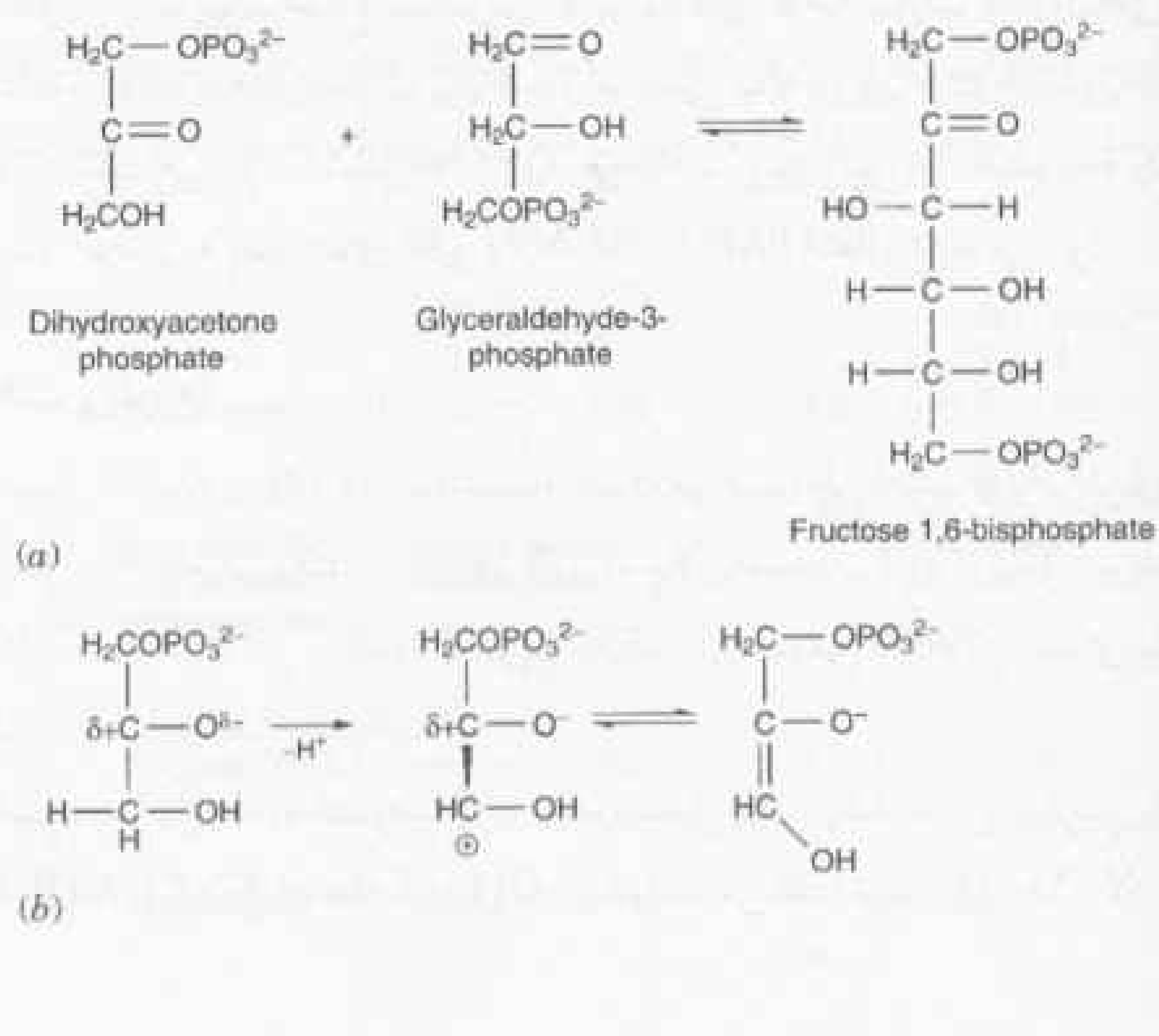
واکنش‌های یونی نیازی به یون‌ها ندارند

اکثر واکنش‌هایی که در طبیعت یافت می‌شوند را می‌توان با مدل‌های یونی توجیه نمود. به‌عبارت دیگر، اکثر واکنش‌های سلولی نیاز به تغییرات مثبت و منفی در داخل ملکول‌ها

دارند تا امکان تعامل اجزاء فراهم گردد. آنزیم می‌تواند پروتون‌ها را به سوبسترا افزوده یا از آن بردارند تا بار آن تغییر نماید و یا یک گروه خنثی آنزیم یونی شود. برداشت یک پروتون، یک گروه را نوکلئوفیل‌تر می‌کند که گروهی (نوکلئوفیلی) است که به یک مرکز مثبت حمله می‌کند. برای مثال، OH^- نوکلئوفیلیک‌تر از آب و سیستئین یونیزه نوکلئوفیلیک‌تر از اتم سولفور غیریونیزه می‌باشد. به‌طور مشابه، آنزیم‌ها می‌توانند گروهی را پروتونه و آن را مثبت کنند تا نسبت به حمله نوکلئوفیلیک حساس‌تر شود. در هنگام هیدرولیز یک پیوند پپتیدی، گروه نوکلئوفیلیک‌تر OH^- به این پیوند و نه آب حمله می‌کند. به علاوه، این حمله بر روی یک گروه کربونیل پولاریزه، به‌جای یک گروه کربونیل غیرپولاریزه، خواهد بود که در آن اتم کربن یک بار مثبت نسبی دارد (شکل ۱۴-۱۰). افزودن و برداشت پروتون‌ها را به ترتیب **کاتالیز اسید عمومی** و **باز عمومی** گویند. مزیت آنزیم‌هایی که از کاتالیز اسید عمومی و باز عمومی استفاده می‌کنند، این است که در pH خنثی فیزیولوژیک، قادر به کاتالیز یک واکنش حتی با وجود غلظت بسیار پایین OH^- و H^+ می‌باشند.

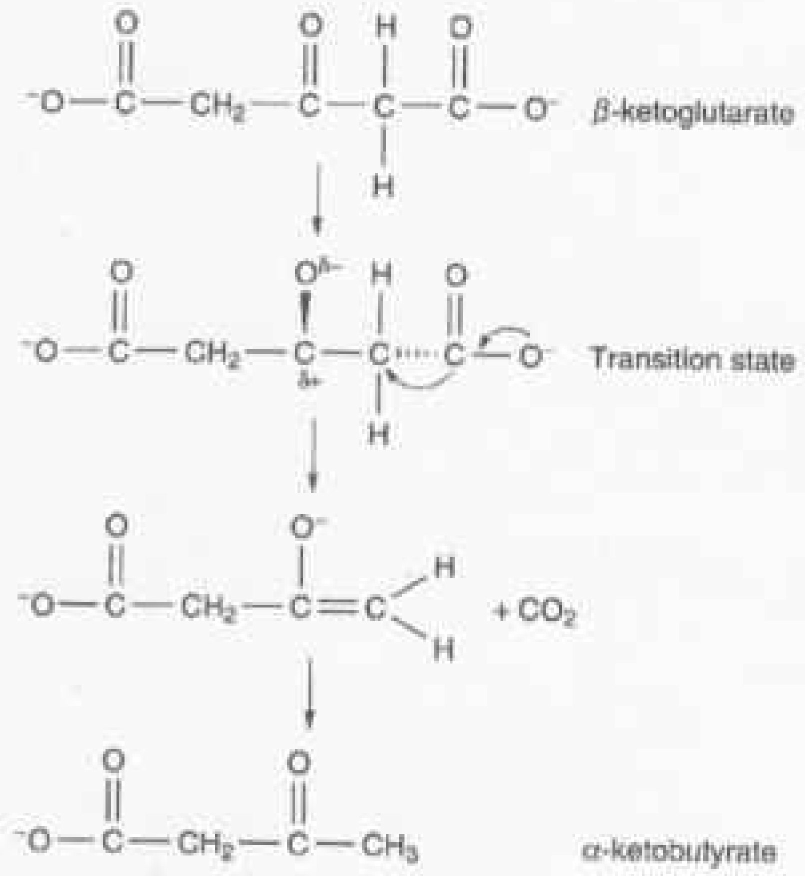
پیوندهای دارای بار نسبی

یک راه معمول تولید یک پیوند کربن-کربن، داشتن یک حمله کربانیونی به گروه کربونیل می‌باشد که آن را می‌توان با واکنش تولید فروکتوز ۱،۶- بیس‌فسفات از دو ترکیب سه کربنه شرح داد (شکل ۱۶a-۱۰). وجود گروه کربونیل در دی‌هیدروکسی‌استن فسفات، اتم‌های هیدروژن موجود در کربن مجاور را اسیدی‌تر می‌کند. آنزیم یک پروتون برداشته و یک بار منفی بر روی کربن باقی می‌گذارد. الکترون‌های یک ریشه گروه کربونیل به اکسیژن نزدیک‌تر می‌باشند؛ لذا کربن یک بار مثبت نسبی دارد. این باعث تثبیت کربانیون می‌شود،



شکل ۱۶-۱۰ یک گروه کربونیل یک بار منفی را بر روی کربن مجاور تثبیت می‌کند. (a) واکنش دی‌هیدروکسی استن فسفات و گلیسرآلدئید ۳-فسفات در جهت تولید فروکتوز ۱،۶- بیس‌فسفات. (b) وضعیت‌های انتقالی دی‌هیدروکسی‌استن فسفات . بار مثبت نسبی موجود برروی کربن می‌تواند تحت حمله یک کربانیون قرار گرفته تا تولید یک پیوند کربن-کربن جدید شود. وجود این گروه کربونیل امکان برداشت یک پروتون از اتم کربن مجاور را فراهم می‌سازد تا کربانیون تولید شود.

زیرا الکترون‌ها جابه‌جا شده و تنها با یک کربن باقی نمی‌مانند. سپس این کربانیون به گروه کربونیل حمله کرده تا پیوند جدیدی تشکیل شود. آنزیم هم دو سوبسترا را در کنار یکدیگر قرار می‌دهد تا احتمال تصادم مساعد افزایش یابد، و هم سبب دپولاریزاسیون پیوند کربونیل و برداشت یک پروتون می‌شود.



شکل ۱۷-۱۰ دکربوکسیلاسیون β-کتوبوتیرات. دکربوکسیلاسیون β-کتوبوتیرات به این دلیل رخ می‌دهد که بار نسبی مثبت موجود بر روی کربن گروه کربونیل سبب تثبیت بار منفی حاصل از آغاز تجزیه پیوند به گروه کربوکسیل می‌شود. یک کربونیل مجاور CO_2 ترک‌کننده قادر به تثبیت این بار نیست.

اهمیت گروه کربونیل

بسیاری از تغییرات متابولیکی براساس ماهیت اختصاصی گروه کربونیل و توانایی آن در تثبیت یک بار منفی بر روی کربن مجاور آن می‌باشد. برای مثال، β-کتواسیدهایی نظیر β-کتوگلوتارات (شکل ۱۷-۱۰) می‌توانند کربوکسیله شوند، ولی از نظر انرژتیک دکربوکسیلاسیون یک α-کتواسید نظیر پیرووات مشکل است. وقتی پیوند $-CH_2-COO^-$ می‌شکند، الکترون‌های موجود در پیوند بر روی کربن β باقی می‌مانند. ایجاد بار منفی بر روی چیزی که کربن β بود، می‌تواند بار مثبت نسبی موجود بر روی کربن کربونیل را تثبیت کند. این آنزیم حالت انتقالی را از طریق یک تعامل پروتونی با اکسیژن کربونیل که به دلیل رزونانس کربن کربونیل، به‌طور نسبی منفی است و ایجاد بار منفی بر روی کربن β، تثبیت می‌کند.

برعکس، پیرووات نمی‌تواند متحمل یک واکنش دکربوکسیلاسیون ساده شود، زیرا راهی برای تثبیت بار منفی نیست که از جدایی گروه CO_2 باقی خواهد ماند. برای دکربوکسیلاسیون α-کتو اسیدها نیاز به کوآنزیم می‌باشد.

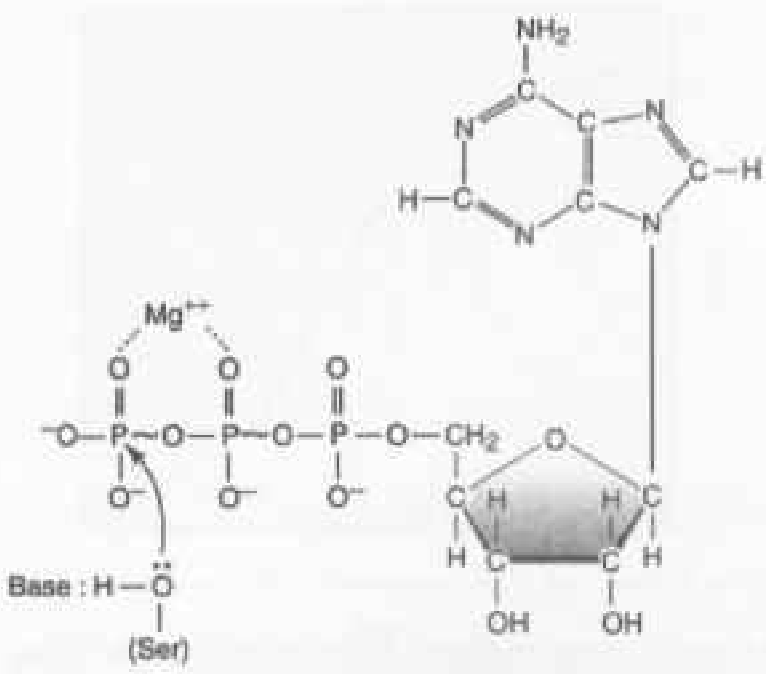
اکسیداسیون‌ها

حتی واکنش‌های اکسیداسیون نیز یک جزء یونی دارند. در هنگام اکسیداسیون یک الکل به یک آلدئید/کتون یا یک پیوند اشباع‌شده کربن-کربن، الکترون‌ها به صورت الکترون‌های آزاد برداشت نشده، بلکه به صورت یک یون هیدرید، یعنی یک پروتون و دو الکترون با یک بار منفی، برداشت می‌شوند (شکل ۱۸-۱۰). برخلاف پروتون، این یون هیدرید وارد حلال نشده و در عوض به پذیرنده‌ای نظیر NAD(P) یا FAD انتقال داده می‌شود.

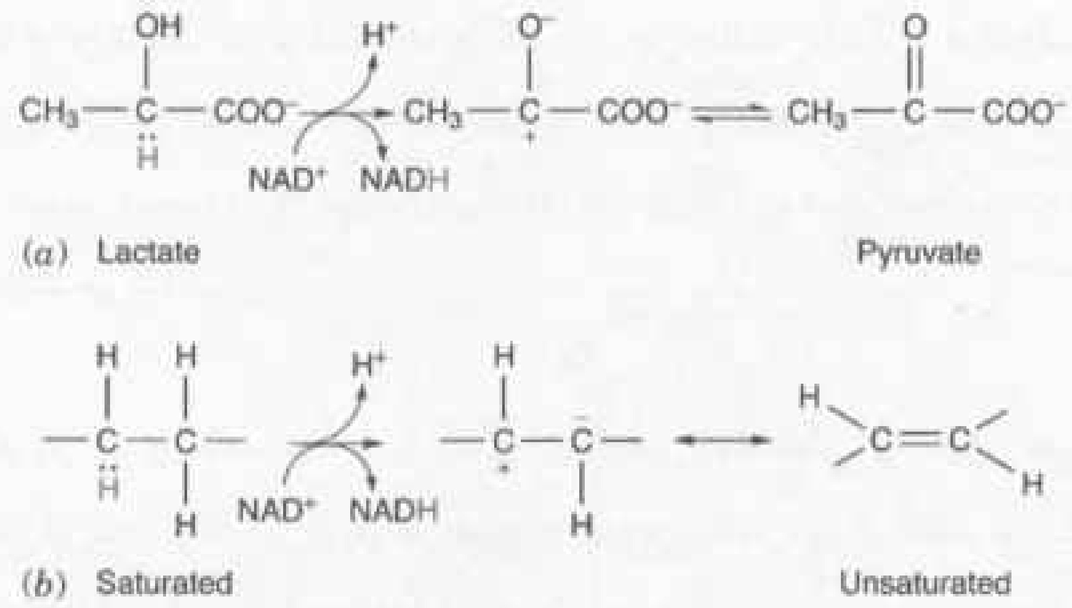
افزودن و برداشت پروتون‌ها

اکثر آنزیم‌ها به‌شکل کارآمدی پروتون‌ها را برداشت و اضافه می‌کنند، ولی اغلب از یک طریق بی‌همتا این عمل را انجام می‌دهند. پروتئازها قادر به پولاریزه‌نمودن گروه کربونیل پیوند پپتیدی به شکلی هستند که این پیوند را از طریق کاتالیز باز عمومی یا کاتالیز اسیدی یا کاتالیز یون فلزی، راحت‌تر هیدرولیز کنند.

فسفریلاسیون پروتئین‌ها، به‌خصوص گروه هیدروکسیل یک ریشه سرین، ترئونین یا تیروزین توسط ATP یا GTP با حمله گروه OH- پیشرفت می‌کند (شکل ۱۹-۱۰). لازم



شکل ۱۹-۱۰ فسفریلاسیون حمله یک نوکلئوفیل به یک نوکلئوزید تری‌فسفات (NTP) می‌باشد. ATP یا شکل دیگری از NTP تحت حمله یک جفت الکترون موجود بر روی اکسیژن یک الکل نظیر سرین، ترئونین یا تیروزین قرار می‌گیرد. یک یون Mg^{2+} وقتی به NTP متصل می‌شود، الکترون‌ها را از گروه فسفر دور نموده و آن را نسبت به حمله توسط این نوکلئوفیل حساس‌تر می‌کند.

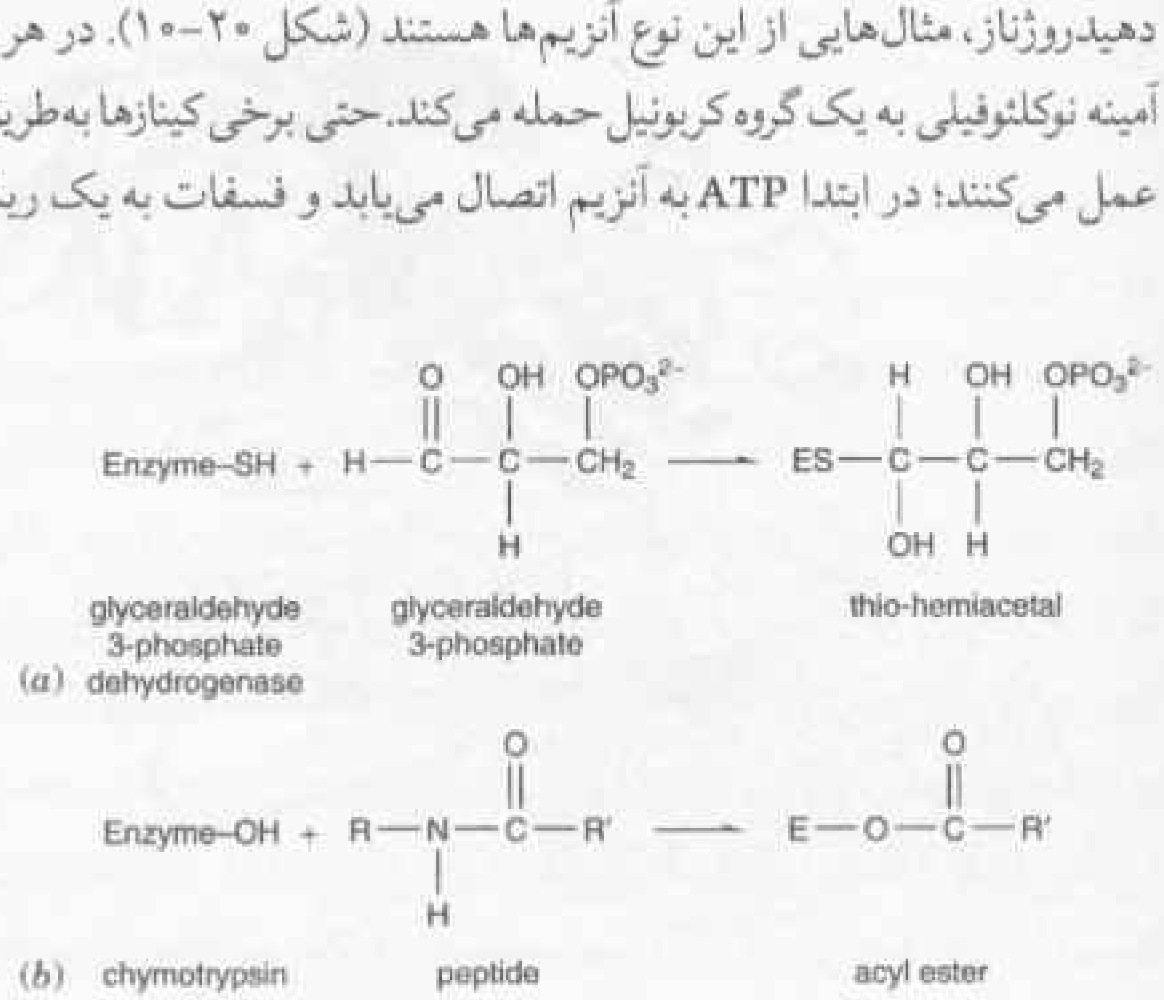


شکل ۱۸-۱۰ اکسیداسیون لاکتات و یک پیوند کربنی اشباع. (a) لاکتات به پیرووات. (b) پیوند اشباع به یک پیوند غیراشباع. این واکنش‌ها متحمل یک واکنش نوع-یونی می‌شوند، گرچه یک یون هیدرید (H^-) دخالت دارد.

است OH^- با از دست دادن یک پروتون نوکلئوفیل‌تر شود، در حالی که پیوند اکسیژن-فسفات پولاریزه می‌شود به‌طوری که اتم فسفر به‌طور نسبی مثبت شده و نسبت به حمله نوکلئوفیلی حساس‌تر می‌شود. تقریباً هر آنزیمی (کینازها) که این نوع واکنش را کاتالیز می‌کند، از Mg^{2+} بهره می‌برد. یون‌های دو ظرفیتی می‌توانند به دو یا سه فسفات اتصال یابند. وجود این یون مثبت سبب می‌شود تا الکترون‌های موجود در پیوند $P=O$ به اتم اکسیژن نزدیک‌تر شده و بنابراین یون فسفات را با قدری بار مثبت باقی بگذارد.

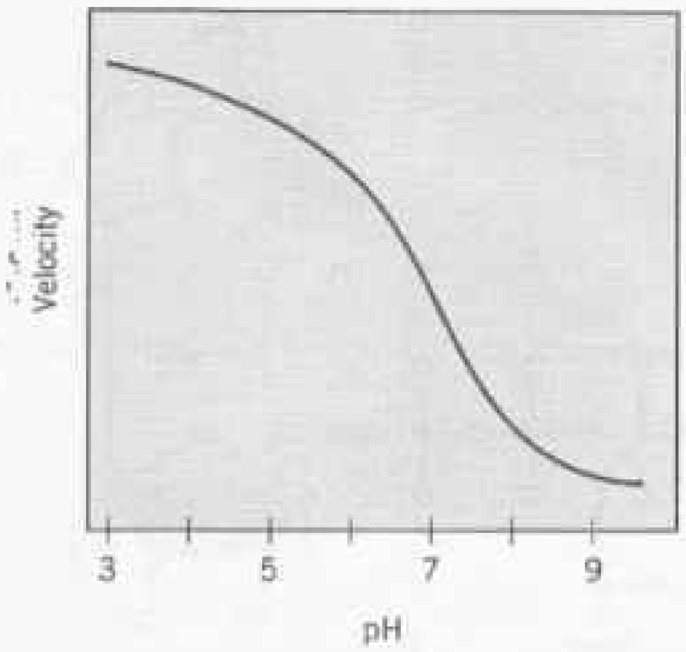
اتصال کووالان سوبسترا به آنزیم

آنزیم‌ها نه تنها در اجرای کاتالیز اسید و باز عمومی عمل می‌کنند، بلکه در برخی موارد سوبسترا یک پیوند کووالان با آنزیم به‌وجود می‌آورد. کیموتریپسین و گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز، مثال‌هایی از این نوع آنزیم‌ها هستند (شکل ۲۰-۱۰). در هر مورد، یک اسید آمینه نوکلئوفیلی به یک گروه کربونیل حمله می‌کند. حتی برخی کینازها به‌طریق کاتالیز کووالان عمل می‌کنند؛ در ابتدا ATP به آنزیم اتصال می‌یابد و فسفات به یک ریشه نوکلئوفیلیک



شکل ۲۰-۱۰ برخی سوبستراها با یک آنزیم ایجاد پیوند کووالان می‌کنند. (a) گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز و (b) کیموتریپسین ابتدا با تشکیل یک ترکیب واسط با سوبسترا عمل می‌کنند.

انتقال یافته و تولید یک آنزیم فسفریله می‌کند؛ در این حالت یک گروه هیدروکسیل بر روی یک سرین یا ترئونین فعال شده و حمله اول را انجام می‌دهد. سپس سوبسترا وارد شده و توسط باز عمومی موجود در آنزیم فعال می‌شود؛ این باز به گروه فسفات حمله کرده و محصول نهایی را تولید می‌کند.



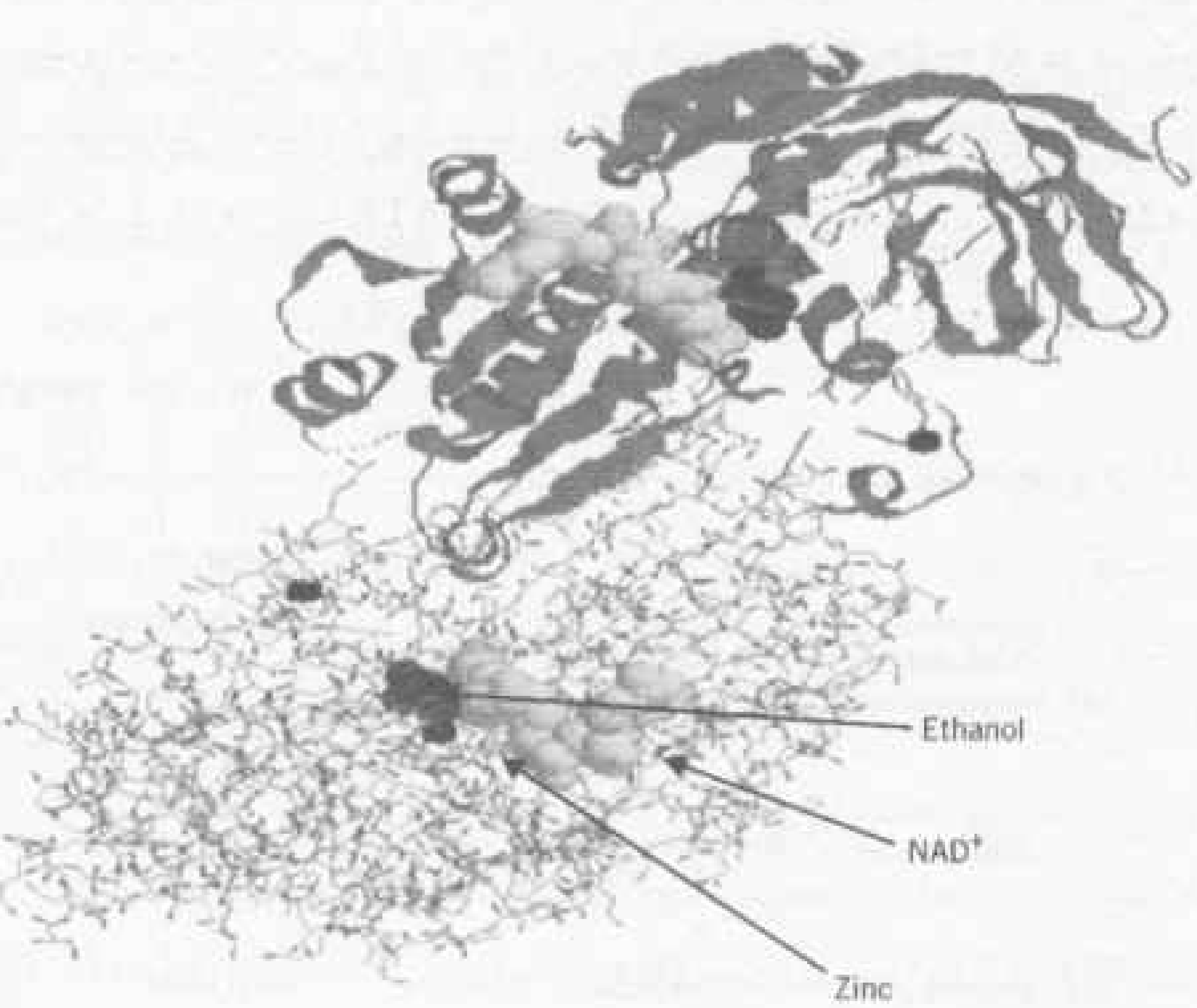
شکل ۲۱-۱۰ وقتی یک گروه یک H^+ را از دست می‌دهد، سرعت یک واکنش آنزیمی می‌تواند تحت تأثیر pH قرار گیرد. در صورتی‌که برای فعالیت کاتالیتیکی یک آنزیم نیاز به پروتوناسیون یک ایمیدازول هیستیدین می‌باشد، سرعت واکنش با افزایش pH به میزان بیش از pK_a (فرض کنید ۷) این ریشه، کاهش خواهد یافت. وقتی برای فعالیت آنزیم نیاز به غیرپروتونه‌نمودن آنزیم است، آنگاه این منحنی شکل معکوس خواهد داشت و حداکثر فعالیت آن در pH بالای ۸ خواهد بود. نصف فعالیت حداکثر در pK_a این گروه وجود خواهد داشت، زیرا ۵۰٪ ملکول‌ها یونیزه و ۵۰٪ آنها غیریونیزه خواهند بود.

pH با اثر بر روی اسیدها و بازهای عمومی، واکنش را تغییر می‌دهد

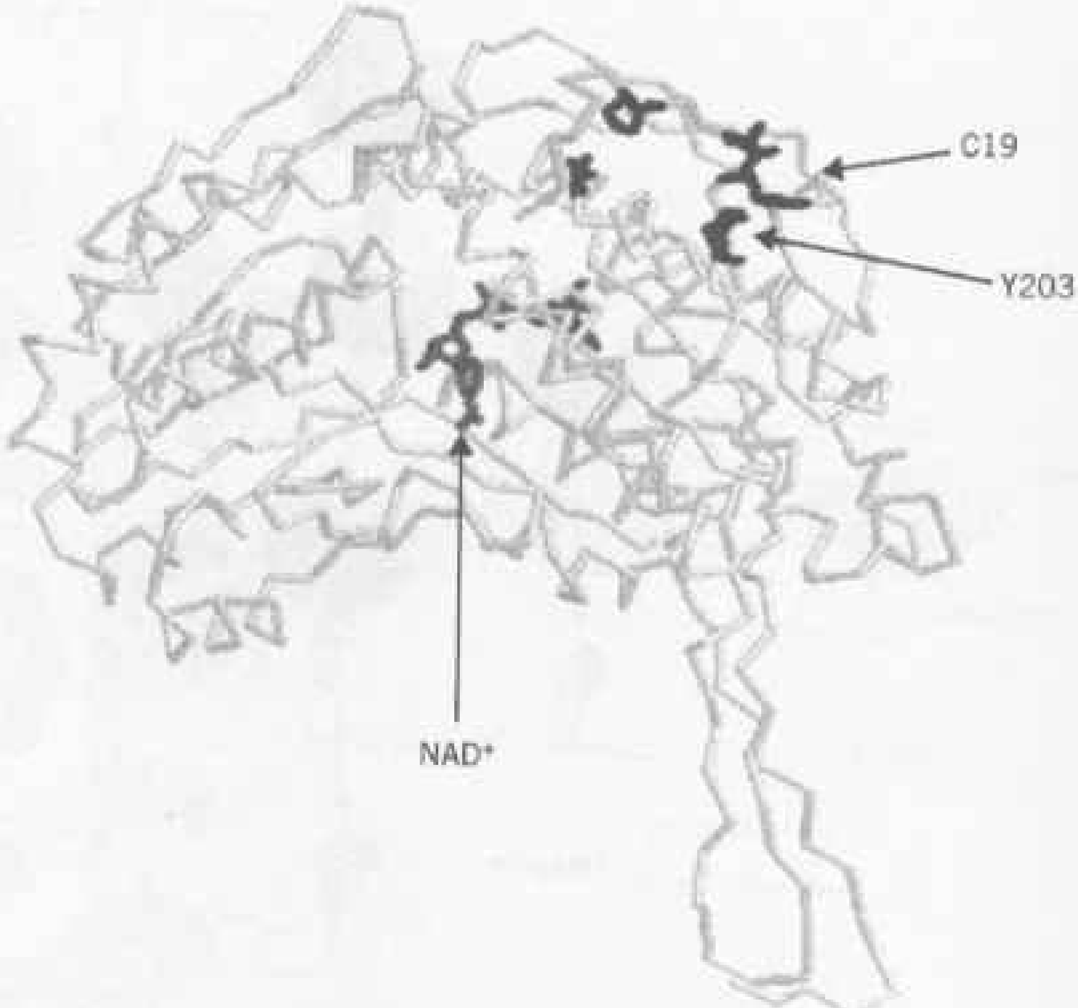
تقریباً تمامی آنزیم‌ها از کاتالیز اسید/باز عمومی بهره می‌برند و دور از انتظار نیست که واکنش تحت تأثیر pH قرار گیرد. آنزیمی که نیاز به یک ریشه هیستیدین به عنوان دهنده پروتون در یک واکنش دارد، در pH بالای ۸ انجام نمی‌شود که در آن بیشتر گروه‌های ایمیدازول فاقد پروتون هستند. pK_a ایمیدازول حدود ۷ است (شکل ۲۱-۱۰). تمامی آنزیم‌ها یک پروفایل pH در برابر سرعت دارند (ص. ۵۴۹) که در برخی موارد دیدگاهی را در خصوص گروه‌های شرکت‌کننده در جایگاه فعال فراهم می‌کند. از آنجایی که ساختمان کلی یک پروتئین در فعالیت کاتالیتیکی مهم است، اگر تغییر pH سبب تغییر کونفورماسیون کلی پروتئین شود، آنگاه فعالیت نیز تغییر خواهد کرد. در برخی بیماری‌ها، pH سلولی طبیعی نیست؛ این وضعیت بر روی فعالیت آنزیم‌های سلولی اثر می‌گذارد.

۴-۱۰ • جایگاه فعال یک آنزیم

جایگاه فعال یک آنزیم در مقایسه با اندازه کلی پروتئین آنزیم، کوچک است. اکثر ریشه‌های اسیدهای آمینه در تماس با سوبسترا قرار ندارند (شکل ۲۲-۱۰). فواصل و زوایای موجود در بین ریشه‌های کاتالیتیک آنزیم و سوبسترا می‌بایست دقیق باشند تا امکان کاتالیز فراهم



شکل ۲۲-۱۰ آنزیم‌ها بسیار بزرگتر از سوبستراهای خود هستند. الکل دهید روژناز با اتانل متصل به Zn^{2+} و NAD^+ موجود در جایگاه فعال. اکثر اسیدهای آمینه پروتئین در تماس با سوبسترا قرار ندارند. یک زیرواحد از این دیمر به صورت نواری و زیرواحد دیگر به صورت مجموعه اتم‌ها نشان داده شده است.

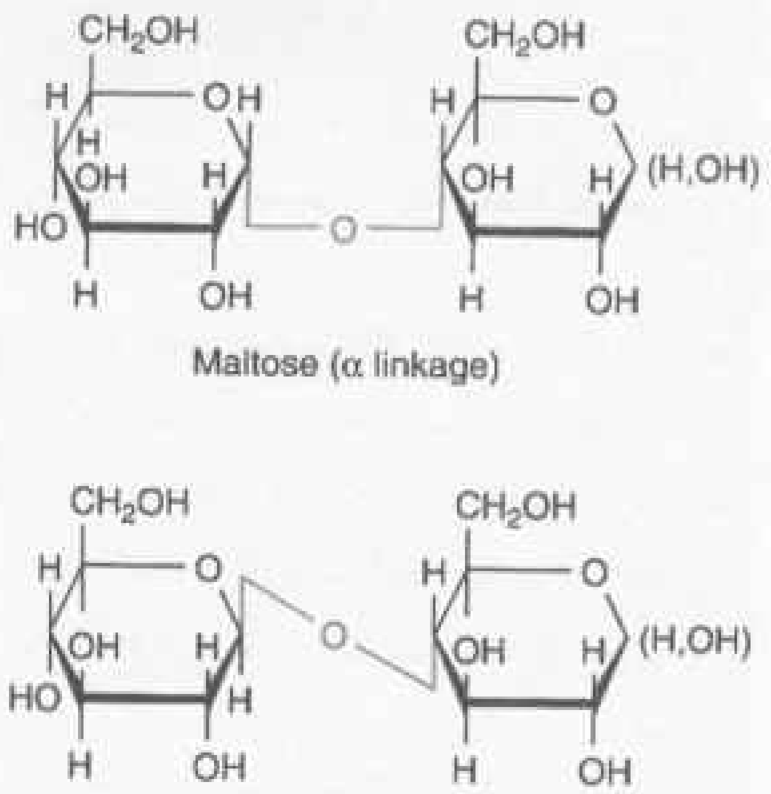


شکل ۲۳-۱۰ اسیدهای آمینه‌ای که در فاصله دوری از جایگاه فعال قرار دارند، مهم هستند. یک ریشه اسید آمینه موجود در سطح یک آنزیم ممکن است برای حفظ آنزیم به شکل مناسب لازم باشد. ریشه ۱۹، یک سیستئین، یک زیرواحد آلدئید دهیدروژناز (با ۵۰۰ اسید آمینه) به تیروزین تغییر داده شد. جهش‌یافته حاصل نامحلول بود. ریشه ۱۹ به‌طورطبیعی به ریشه ۲۰۳ متصل می‌شود که واضحا برای حفظ ساختمان سه-بُعدی مناسب لازم است.

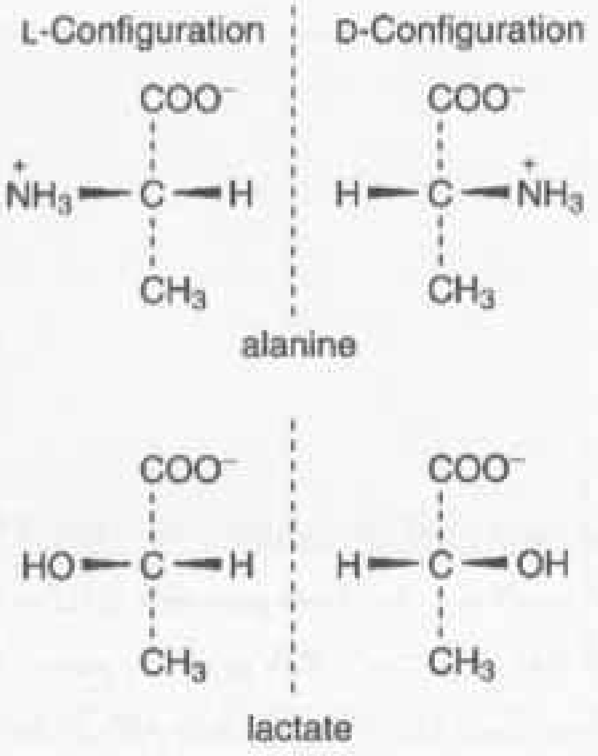
گردد. اکثر اسیدهای آمینه موجود در پروتئین به عنوان یک داربست بزرگ عمل می‌کنند تا امکان صف‌بندی گروه‌های وظیفه‌دار سوبستراها فراهم گردد. جهش در ریشه‌ای که دور از جایگاه فعال قرار دارد، می‌تواند سبب تغییر فعالیت آنزیم شود. این موضوع در شکل ۲۳-۱۰ برای یک جهش نقطه‌ای در آلدئید دهیدروژناز کبد انسان شرح داده شده است.

استویکیومتری جایگاه فعال

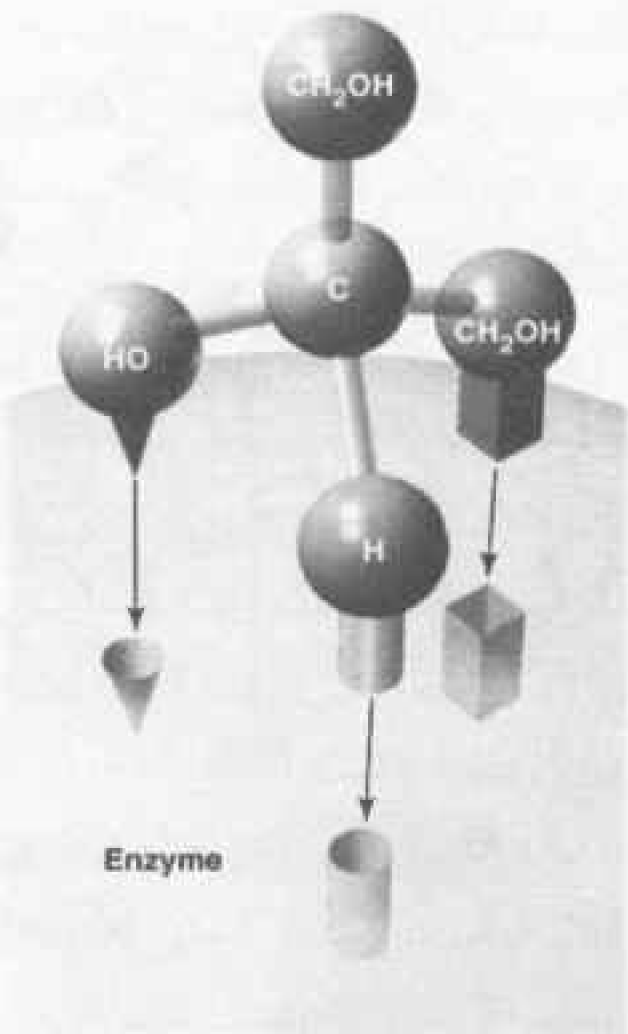
جایگاه فعال برای سوبسترا اختصاصی است. به عنوان مثال، فشارهای هندسی جزئی از هیدرولیز یک اتصال β-گلیکوزیدی بین دو ملکول گلوکز توسط یک آنزیم جلوگیری می‌کند، در حالی که امکان هیدرولیز اتصال α را فراهم می‌سازد (شکل ۲۴-۱۰). آنزیم‌ها همچنین بین ایزومرهای نوری تمایز قائل می‌شوند؛ با وجود اینکه اشکال D و L بسیاری از ترکیبات وجود دارند، سلول‌های پستانداران تنها از یک ایزومر فضایی استفاده می‌کنند. D-لاکتات به‌سختی توسط لاکتات دهیدروژناز پستانداران مورد شناسایی قرار می‌گیرد که برای ایزومر L اختصاصی است (شکل ۲۵-۱۰). این اتصال همچنین می‌تواند با **مراکز پرو-کایرال** صورت گیرد و تولید یک ترکیب دارای فعالیت نوری گردد. یک کربن کایرال چهار گروه متفاوت اتصال‌یافته دارد و از نظر نوری فعال است؛ یک **مرکز پرو-کایرال** کربنی است که از نظر نوری فعال نیست، ولی با اضافه‌شدن یک گروه دارای ویژگی-فضایی، به یک کربن دارای فعالیت نوری تبدیل می‌شود. ترکیبات فاقد فعالیت نوری تنها در یک موقعیت به آنزیم اتصال می‌یابند که واکنش شیمیایی را به سمتی می‌برد که یک محصول خالص دارای فعالیت نوری را تولید می‌کند. گلیسرول که یک ترکیب فاقد فعالیت نوری است، توسط گلیسرول کیناز فسفریله می‌شود؛ تنها محصول L تولید می‌گردد. آنزیم طوری به ترکیب



شکل ۲۴-۱۰ آنزیم‌ها می‌توانند بین اتصالات α و β تمایز قائل شوند. آنزیمی که مالتوز را هیدرولیز می‌کند، سلوبیوز را هیدرولیز نمی‌کند.



شکل ۲۵-۱۰ آنزیم‌ها می‌توانند بین ایزومرهای نوری تمایز قائل شوند.

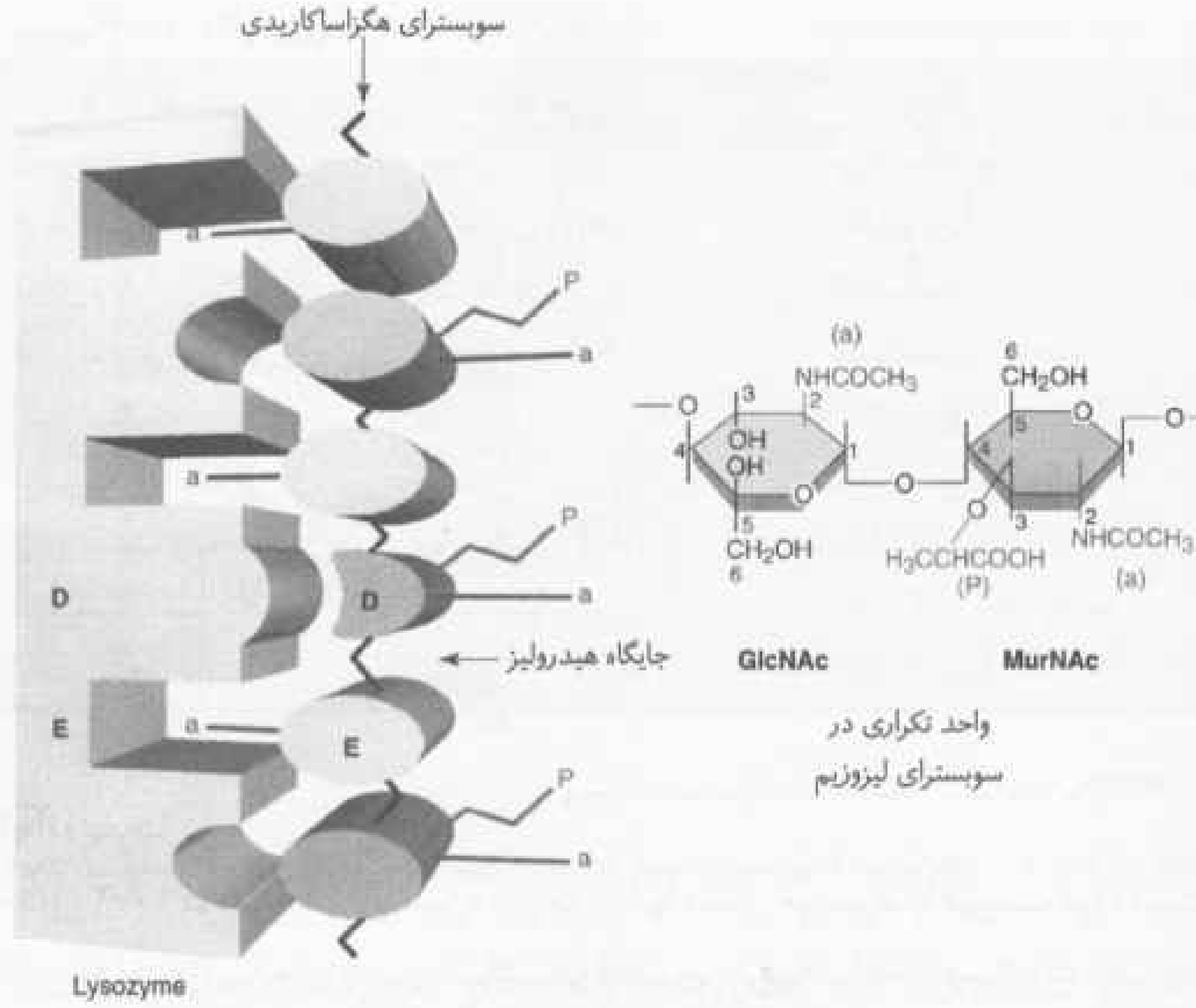


شکل ۲۶-۱۰ اتصال سه-نقطه‌ای یک سوبسترای قرینه به یک جایگاه اتصال به سوبسترا. گلیسرول کیناز به دلیل داشتن جایگاه‌های اتصالی متفاوت برای H- وگروه OH- گلیسرول، تنهاگروه α- هیدروکسی-متیل موجود را به جایگاه فعال اتصال می‌دهد. محصول این واکنش کینازی، L-گلیسرول ۳-فسفات می‌باشد. جایگاه فعال، کادر سمت راست است.

اتصال می‌یابد که تنها یک الکل اولیه در نزدیکی ATP قرار گیرد. علت رخداد این حالت این است که سطح آنزیم نامتقارن اسید، زیرا آمینو اسیدها همگی کونفیگوراسیون L دارند و مارپیچ‌ها همگی راست‌گردان می‌باشند (ص ۱۲۵). هرچند احتمالاً برای سادگی بیشتر، اغلب گفته می‌شود که یک اتصال سه-نقطه‌ای سوبسترا به آنزیم وجود دارد، لذا یک محصول دارای فعالیت نوری خالص از یک مرکز پرو-کایرال تولید می‌شود (شکل ۲۶-۱۰). برای بحث پیرامون نحوه تشریح شیمی‌فضایی برخی مکانیسم‌های آنزیمی، یک نگاه دقیق‌تر ۲-۱۰ را ببینید.

اثر گروه‌ها بر روی سوبسترا در محلی قبل از پیوندی که قرار است تغییر داده شود

شیمی جایگاه فعال در برخی موارد مستلزم یک بخش محدود سوبسترا می‌باشد، ولی برای انجام واکنش ممکن است نیاز به بخش‌های متصل‌کننده سوبسترا می‌باشد. برای مثال، پروتئین پپتیداز پردازش‌کننده-میتوکندریایی برای فعالیت نیاز به حداقل ۱۲ ریشه قبل از جایگاه هیدرولیز دارد. لیزوزیم به عنوان آنزیمی که دیواره سلول باکتری را هیدرولیز می‌کند، نیاز به ریشه‌های قندی موجود در هر دو سمت پیوندی دارد که قرار است شکسته شود (شکل ۲۷-۱۰). اتصال قسمت‌های قندی مجاور به ایجاد تغییری در کونفورماسیون قند



شکل ۲۷-۱۰ اتصال هگزاساکارید به جایگاه فعال لیزوزیم. در این سوبسترای مدل که به تصویر کشیده است، اشکال بیضی اشاره به حلقه‌های پیرانوزی واحدهای تکراری سوبسترای لیزوزیم دارند که در سمت راست نشان داده شده است. حلقه D تحت فشار آنزیم با کونفورماسیون نیمه-صندلی وجود دارد و هیدرولیز بین حلقه‌های D و E رخ می‌دهد. شش زیرجایگاه موجود در آنزیم به سوبسترا اتصال می‌یابند. جایگاه‌های دیگر برای گروه‌های استامیدو (a) اختصاصی هستند ولی قادر به قبول زنجیرهای جانبی لاکتیل (P) نیستند که بر روی ریشه‌های اسید N-استیل‌موراميک قرار دارند. لذا این سوبسترا تنها می‌تواند در یک جهت به آنزیم اتصال یابد.

در محل پیوندی کمک می‌کند که قرار است شکسته شود. لذا جایگاه فعال بیش از ریشه‌های اسید آمینه درگیر در تجزیه یا تولید پیوند می‌باشد؛ این جایگاه یک ناحیه پیچیده بر روی آنزیم است که ساختمان خود را می‌تواند با سوبسترای مناسب تطابق دهد و حالت انتقالی را تثبیت نماید.

۵-۱۰ • کوآنزیم‌ها، کو-سوبستراها، و کوفاکتورها

بسیاری از آنزیم‌ها طی واکنش آنزیمی نیاز به همکاری یک ملکول غیرپروتئینی دارند. **کوآنزیم‌ها** ملکول‌های آلی کوچکی هستند که اکثراً از ویتامین‌ها مشتق می‌شوند (فصل ۲۶). کوآنزیم‌ها در واکنش‌های مختلف زیادی نقش دارند و ممکن است طی واکنش تغییر کنند یا نکنند. آنهایی که تغییر می‌کنند را کو-سوبسترا نیز می‌نامند. در برخی واکنش‌ها انرژی حاصل از هیدرولیز ATP لازم است، بدون اینکه فسفات در محصول قرار گیرد؛ در این حالت ATP یک کو-سوسترا است. بسیاری از واکنش‌های آنزیمی نیاز به یون‌های فلزی دارند که **کوفاکتور** نامیده می‌شوند.

یک نگاه دقیق‌تر ۲-۱۰

استوکیومتری به تشریح مکانیسم واکنش‌های آنزیمی کمک می‌کند

بسیاری از سوبستراهای طبیعی فعالیت نوری دارند. استوکیومتری محصول می‌تواند سرنخی برای تعیین مکانیسم مورد استفاده توسط آنزیم‌ها باشد. برای مثال، اگر طی واکنش تولید یک کربانیون شود، می‌توان انتظار داشت محصول راسمیک باشد. هر چند، یک واکنش آنزیمی یون کربانیوم تولید محصولی با حفظ کونفیگوراسیون شیمی فضایی خواهد نمود. یون کربانیوم در محلول آزاد نبوده، بلکه مرتبط با آنزیم خواهد بود، لذا حمله نوکلئوفیلی ورودی تنها می‌تواند از همان جهت گروه ترک‌کننده صورت گیرد. با استفاده از آنزیمی که به طریق کاتالیز کووالان عمل می‌کند می‌توان کونفیگوراسیون را حفظ نمود. واکنش‌هایی که توسط یک مکانیسم پینگ-پنگی کاتالیز می‌شوند (ص ۵۵۰) مستلزم دو مرحله معکوس‌سازی هستند که سبب تولید محصولی با حفظ کونفیگوراسیون می‌شود. به عنوان مثال، فسفرولیز یک دی‌ساکارید با قندی در کونفورماسیون β آغاز می‌شود و با یک محصول فسفریله خاتمه می‌یابد که آن هم β است. اتصال سوبسترا به آنزیم سبب معکوس‌سازی به یک کونفیگوراسیون α می‌شود، ولی حمله فسفات سبب معکوس‌سازی دیگری می‌شود که نتیجه آن حفظ کونفیگوراسیون است. در صورتی که این واکنش با یک حمله مستقیم فسفات برروی سوبسترا انجام شود، آنگاه محصول معکوس خواهد شد. معکوس‌سازی کونفیگوراسیون در یک کربن دارای فعالیت نوری معمولاً زمانی رخ می‌دهد که یک کمپلکس چهارتایی و حملات نوکلئوفیلی به سوبسترا وجود دارد.

جدول ۳-۱۰ • کوآنزیم‌ها

کوآنزیم	ویتامین	واکنش
بیوتین	بیوتین	کربوکسیلاسیون
کوبالامین (B_{12})	کوبالامین (B_{12})	آلکیلاسیون
کوآنزیم A	پانتوتنات	انتقال آسیل
کوآنزیم‌های فلاوینی	ریبوفلاوین (B_2)	اکسیداسیون - احیاء
اسید لیپوئیک		انتقال آسیل
کوآنزیم‌های نیاسینی	نیاسین	اکسیداسیون - احیاء
پیریدوکسال فسفات	پیریدوکسین (B_6)	انتقال گروه آمینو
تتراهیدروفولات	اسید فولیک	انتقال گروه یک - کربنه
تیامین پیروفسفات	تیامین	انتقال کربونیل

کوآنزیم‌ها

جدول ۳-۱۰ کوآنزیم‌ها و ویتامین‌هایی که از آنها مشتق می‌شوند را فهرست کرده است. کوآنزیم‌ها در واکنش‌های آنزیمی شرکت می‌کنند، ولی ترکیبات اصلی نیستند که تغییر پیدا می‌کنند. برخی کوآنزیم‌ها در فعالیت بسیاری از آنزیم‌های مختلف همکاری می‌کنند، در حالی‌که بقیه تنها در تعداد محدودی از آنها شرکت می‌کنند. کوآنزیم‌ها تمایلاتی برای آنزیم‌های اختصاصی دارند و ممکن است اتصال محکم یا کووالان داشته باشند. برخی کوآنزیم‌ها طی واکنش تغییر می‌یابند، ولی در انتهای واکنش به حالت اول خود برمی‌گردند، در حالی که بقیه در انتها تغییریافته باقی می‌مانند. در صورتی‌که در انتها تغییریافته باشند، برای برگشت به حالت اولیه می‌بایست در واکنش دیگری شرکت کنند. کوآنزیم‌ها با غلظت منطقاً ثابتی در سلول‌ها وجود دارند و نقش پویایی در متابولیسم دارند. واژه آپوآنزیم برای اشاره به آنزیمی استفاده می‌شود که فاقد کوآنزیم اتصال‌یافته است و هولوآنزیم اشاره به آنزیم متصل به کوفاکتور دارد. اهمیت جایگاه اتصالی کوآنزیم و نحوه ایجاد اختلالات متابولیکی در هنگام تغییر این جایگاه در ارتباط بالینی ۲-۱۰ مورد بحث قرار گرفته است.

NAD و NADP اشکال کوآنزیمی نیاسین هستند

نیکوتینامید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD) و نیکوتینامید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADP) (شکل ۲۸-۱۰) مشتقات نیاسین هستند (ص ۱۴۳۱) و در واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء همکاری می‌کنند که توسط دهیدروژنازها کاتالیز می‌شوند. تفاوت بین NAD^+ و $NADP^+$ در وجود یک گروه فسفات بر روی کربن ′۲ ریبوز آدنین می‌باشد. فرهنگ مخفف‌های مربوط به این کوآنزیم‌ها در یک نگاه دقیق‌تر ۳-۱۰ شرح داده شده است. یک واکنش دهیدروژناز عمومی نیازمند NAD^+ در شکل ۲۹-۱۰ نشان داده شده است. گرچه اکثر دهیدروژنازها برای یکی از این دو کوآنزیم اختصاصی هستند، برخی می‌توانند

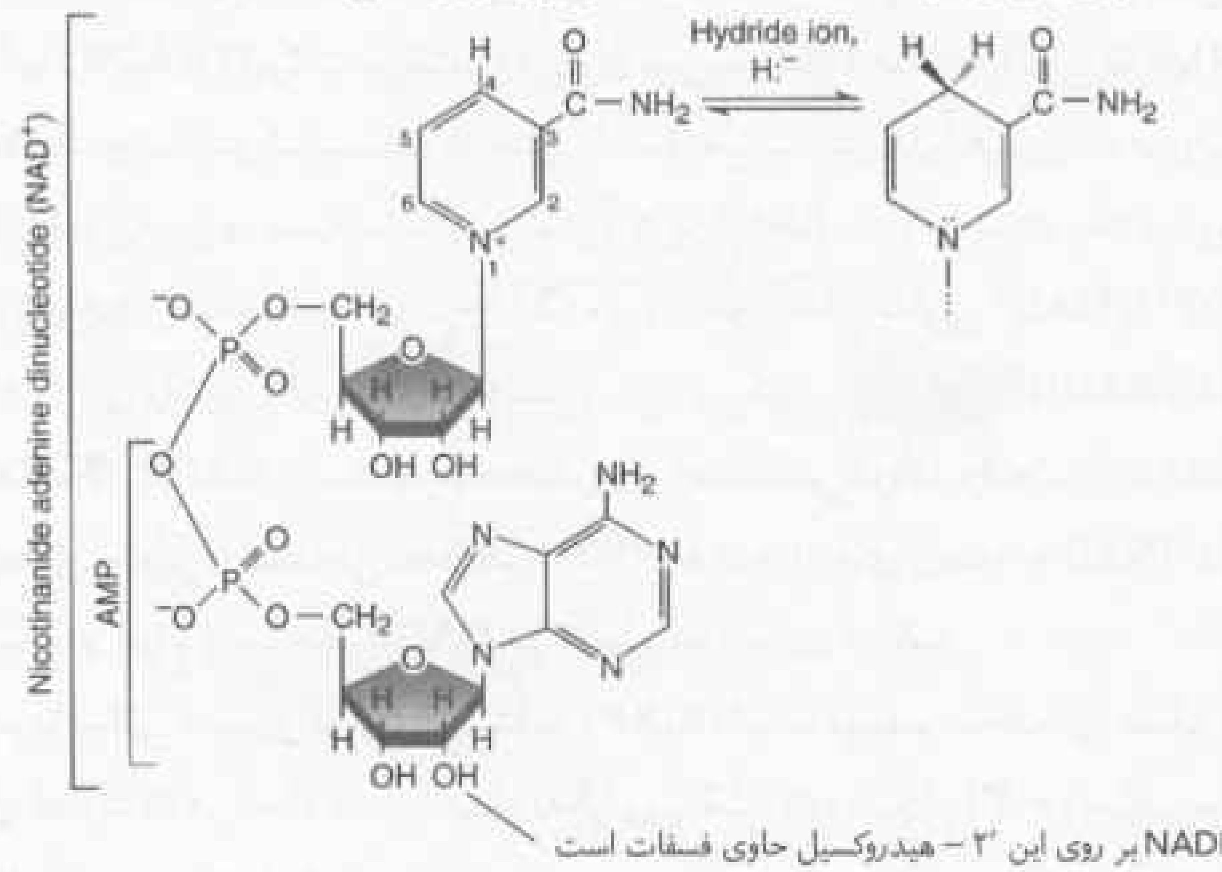
ارتباط بالینی ۲-۱۰

جهش یک جایگاه اتصال به کوآنزیم منجر به بیماری می‌شود

سیستاتیونینوری یک بیماری ژنتیکی است که در آن کمبود γ-سیستاتیوناز وجود دارد و یا این آنزیم غیرفعال است. سیستاتیوناز واکنش زیر را کاتالیز می‌کند

Cystathionine → cysteine
+ α − ketobutyrate

کمبود این آنزیم منجر به تجمع سیستاتیونین در پلاسما می‌شود. از آنجایی که سیستاتیوناز یک آنزیم وابسته به پیریدوکسال فسفات است، ویتامین B_6 به بیمارانی تجویز شد که فیبروبلاست‌های آنها حاوی موادی بودند که با آنتی‌بادی‌های ضد سیستاتیوناز واکنش متقاطع داشتند. بسیاری از این بیماران به درمان با B_6 درمانی به صورت کاهش میزان پلاسمایی سیستاتیونین پاسخ دادند. این بیماران آپوآنزیمی را تولید می‌کردند که با این آنتی‌بادی واکنش می‌داد. در یک بیمار، فعالیت آنزیم در هُموژنات‌های فیبروبلاستی قابل جستجو نبود، ولی با افزدن ۱ mM پیریدوکسال فسفات به مخلوط واکنش، تا ۳۱٪ طبیعی افزایش یافت. معتقدند که K_m اتصال پیریدوکسال فسفات به آنزیم به دلیل جهشی در جایگاه اتصالی افزایش یافته است. با افزایش غلظت کوآنزیم، فعالیت تا حدودی برمی‌گردد. به‌طور واضحی این بیماران برای حفظ فعالیت γ-سیستاتیوناز نیاز به غلظت حالت-پایدار کوآنزیم دارند.



شکل ۲۸-۱۰ **نیکوتینامید آدنین دی‌نوکلئوتید (NAD) و نیکوتینامید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADP).**

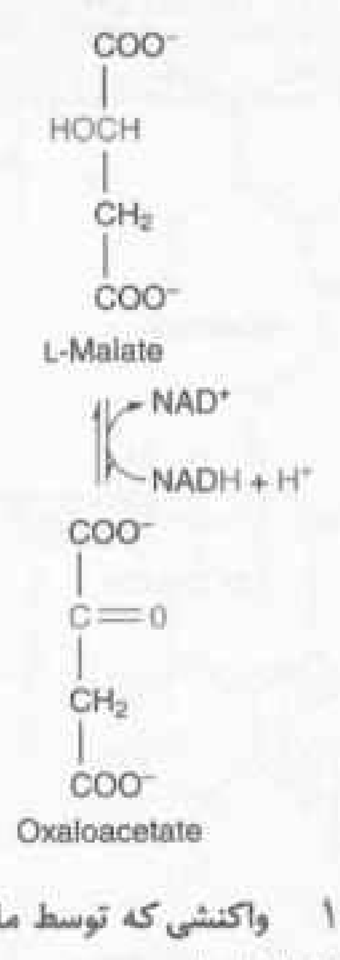
یک نگاه دقیق‌تر ۳-۱۰

مخفف‌هایی برای NAD و NADP

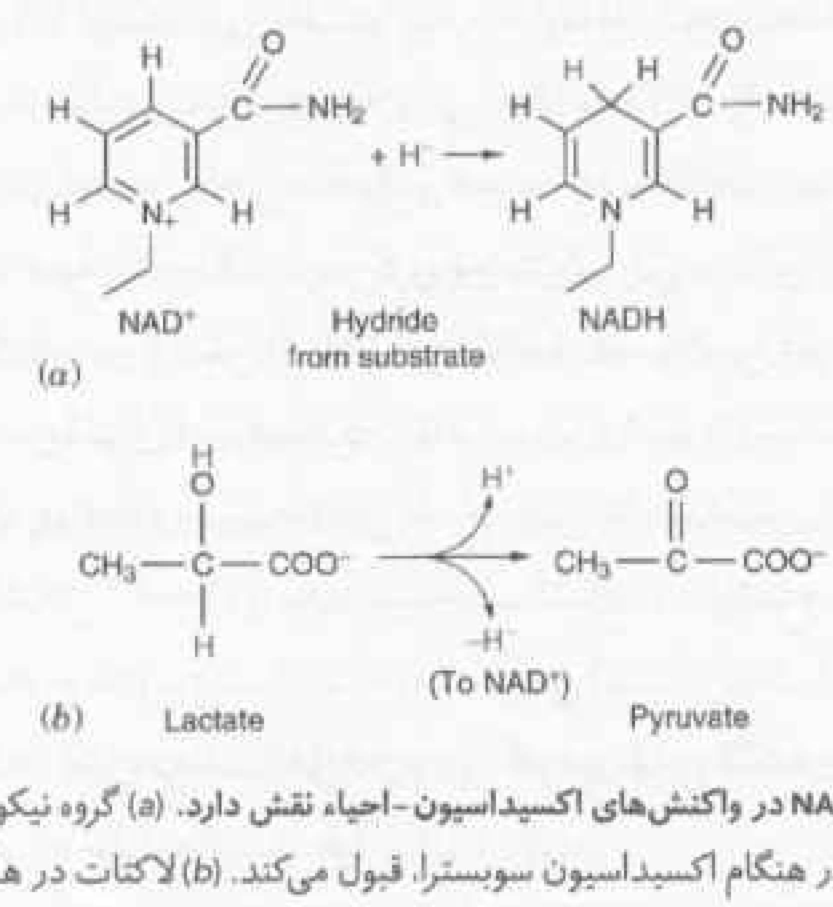
برای اشاره به کوآنزیم‌ها در حالت اکسیده یا احیاءشده از NAD یا NADP استفاده می‌شود. NAD^+ و $NADP^+$ اشکال اکسیده، و NADH و NADPH اشکال احیاءشده را نشان می‌دهند. برخی از آنزیم‌ها از NAD یا NADP استفاده می‌کنند، لذا به آنها آنزیم‌های وابسته به NAD(P) گفته می‌شود.

از هر دو استفاده کنند. اکثر دهیدروژنازها واکنش‌های قابل‌برگشتی را کاتالیز می‌کنند.

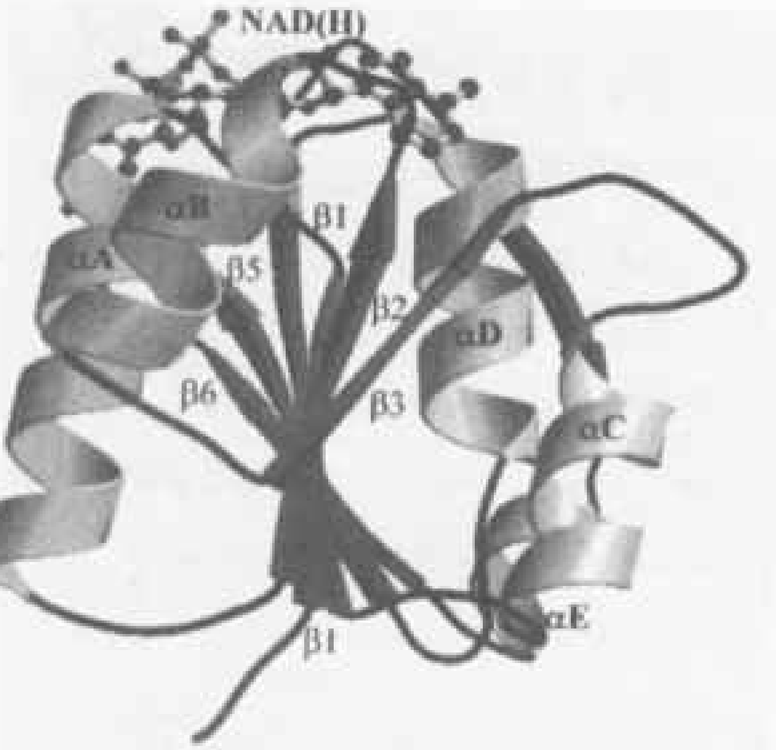
قسمت وظیفه‌دار کوآنزیم اکسیدشده، حلقه نیکوتینامیدی است که یک اتم نیتروژن در موقعیت ۱ دارد و به‌دلیل اتصال به حلقه ریبوز، حاوی یک بار مثبت می‌باشد. این بار مثبت سبب می‌شود تا نیکوتینامید بتواند یک یون هیدرید قبول کند و دو الکترون را انتقال دهد (شکل ۳۰-۱۰). یک کمپلکس سه‌تایی بین آنزیم، کوآنزیم و سوبسترا تولید شده و یک یون هیدرید از سوبسترا به $NAD(P)^+$ انتقال داده می‌شود. یک پروتون از سوبسترا به داخل محیط آزاد می‌گردد. در واکنش عکس، حلقه نیکوتینامیدی احیاءشده همکاری داشته و این



شکل ۲۹-۱۰ **واکنشی که توسط مالات دهیدروژناز کاتالیز می‌شود.** قبل از انتقال یون هیدروید به NAD^+، آنزیم با اتصال NAD^+ و مالات تولید یک کمپلکس سه‌تایی می‌کند.



شکل ۳۰-۱۰ **NAD در واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء نقش دارد.** (a) گروه نیکوتینامید NAD^+ یک یون هیدرید (H^-) را در هنگام اکسیداسیون سوبسترا، قبول می‌کند. (b) لاکتات در هنگام اکسیداسیون به پیرووات، یون هیدرید می‌دهد.



شکل ۳۱-۱۰ فولد راسمن در الکل دهیدروژناز کبدی. NAD(H) به فولد راسمن موجود در اکثر دهیدروژنازها اتصال می‌یابد.

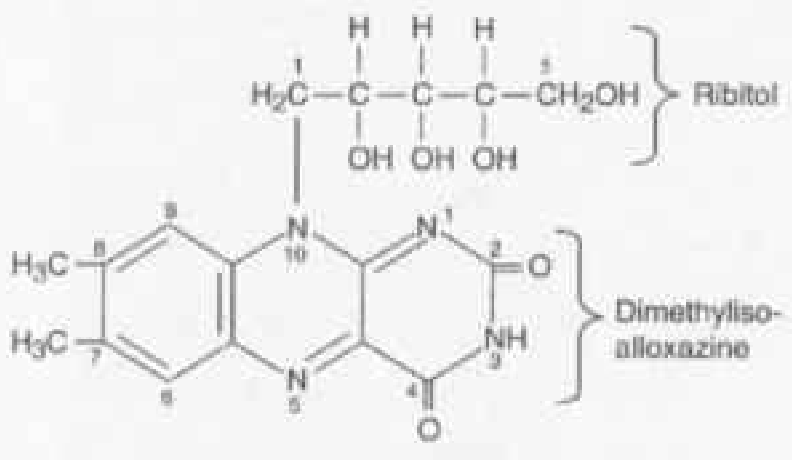
حلقه تا زمان انتقال یون هیدرید به سوبسترای اکسیده، فاقد بار مثبت است. واکنش‌هایی که در آنها (NADP) شرکت می‌کنند را می‌توان یونی در نظر گرفت، زیرا یونی که آنها انتقال می‌دهند یک یون هیدرید است که بار منفی را حمل می‌کند. یون‌های هیدرید به صورت آزاد وجود ندارند؛ این یون‌ها مستقیماً بین سوبسترا و کوآنزیم انتقال داده می‌شوند. بعد از دریافت یا دادن یون هیدرید، کوآنزیم از آنزیم جدا شده و وارد مخزن‌های سلولی NAD^+ یا $NADP^+$ می‌شود و برای واکنش‌های دیگر در دسترس قرار می‌گیرد. نسبت‌های $NAD^+/NADH$ و $NADP^+/NADPH$ وابسته به یک دهیدروژناز اختصاصی نبوده و وضعیت اکسیداسیون-احیاء بخش سلولی را نشان می‌دهد (ص.۷۵۹). دهیدروژنازهای وابسته به NAD اغلب در کاتابولیسم و انواع وابسته به NADP در آنابولیسم شرکت می‌کنند.

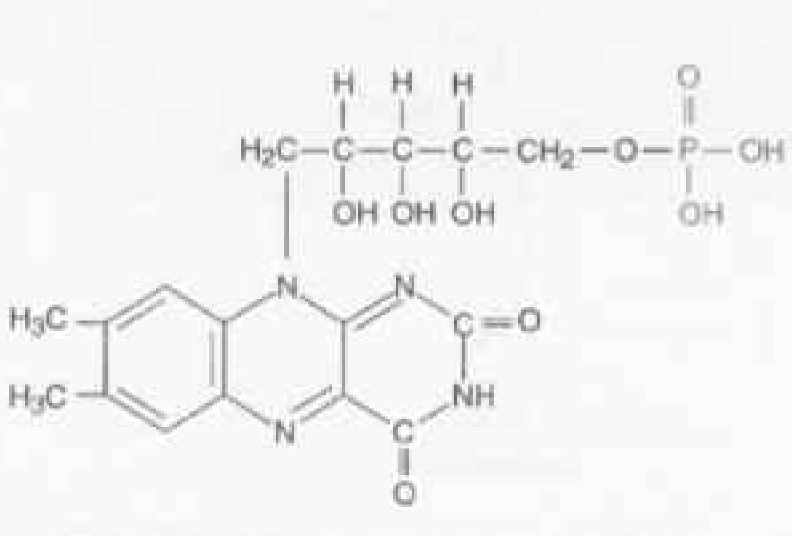
تقریباً تمامی دهیدروژنازهای وابسته به NAD(P) یک موتیف ساختمانی مشابه (**فولد راسمن**[1]) دارند که در ایجاد دومن اتصال به کوآنزیم نقش دارد؛ شکل ۳۱-۱۰ موتیف مربوطه در الکل دهیدروژناز را نشان می‌دهد.

FMN و FAD کوآنزیم‌های ریبوفلاوین هستند

دو کوآنزیم حاصل از ریبوفلاوین شامل **FMN (فلاوین مونونوکلئوتید)** و **FAD (فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید)** می‌باشند. ویتامین ریبوفلاوین متشکل از یک حلقه هتروسیکلیک ایزوآلکسازین (فلاوین) است که از طریق N-10 به الکل ریبیتول متصل می‌باشد (شکل ۳۲-۱۰). در FMN یک فسفات به گروه $5'-OH$ ریبیتول استری شده است. FAD از نظر ساختمانی به دلیل داشتن آدنوزین متصل به قند فلاوین مونونوکلئوتید از طریق یک اتصال پیروفسفاتی، مشابه NAD است (شکل ۳۳-۱۰). هر دو کوآنزیم FAD و FMN در واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء شرکت می‌کنند؛ طی این واکنش‌ها حلقه ایزوآلوکسازین دو الکترون را به شکل یون هیدرید دریافت و یا ازدست می‌دهد. در برخی موارد، این کوآنزیم‌ها گیرنده تک الکترونی هستند که منجر به تولید سمی‌کینون فلاوینی (یک رادیکال آزاد) می‌شود. کوآنزیم‌های فلاوینی به صورت آزاد در داخل محلول وجود ندارند، بلکه با اتصال بسیار محکم یا کووالان می‌باشند. اینها را در حالت اخیر **گروه پروستتیک**[2] گویند. برای این منظور لازم است که آنزیم شرکت‌کننده در واکنش اکسیداسیون تولیدکننده فلاوین اتصال‌یافته احیاءشده، دوباره در احیاء سوبسترای دیگری شرکت کند تا دوباره شکل اکسیده فلاوین تولید شود.

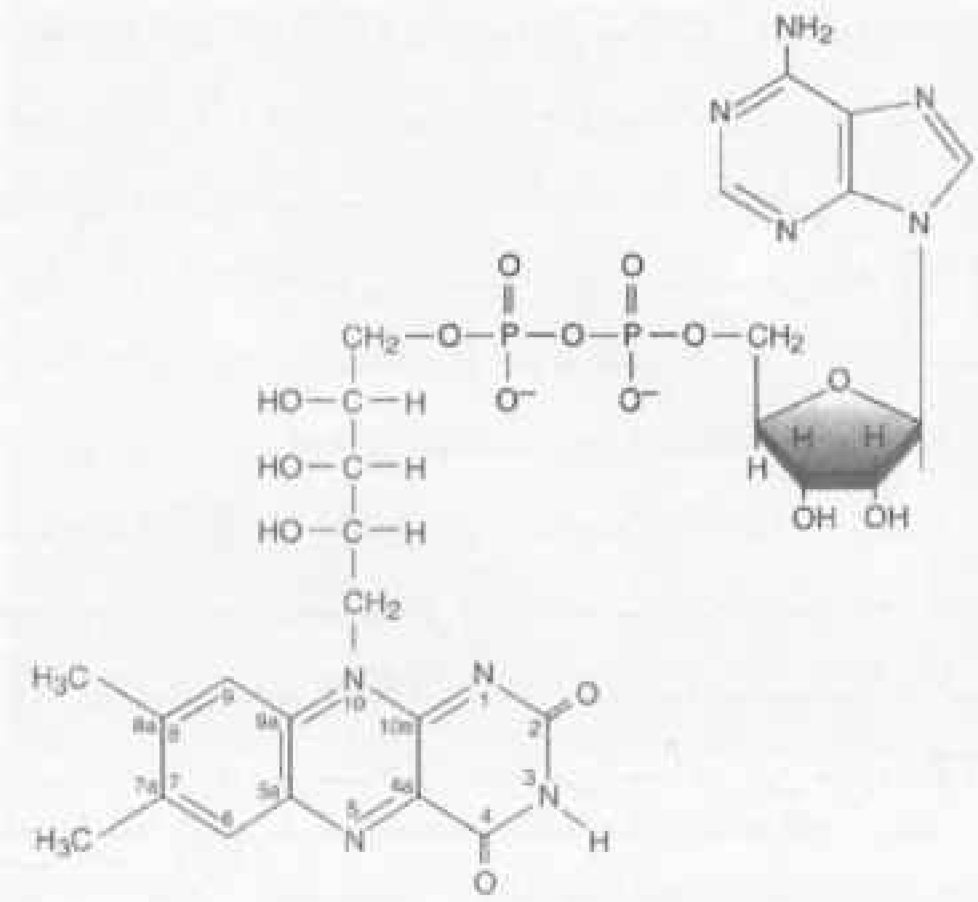
اکسیداسیون پیوندهای کربن-کربن اشباع، نظیر اکسیداسیون اسید سوکسینیک به اسید فوماریک (شکل ۳۴-۱۰) یا یک اسید چرب اشباع به غیراشباع، مستلزم واکنش‌های دهیدروژناز وابسته به فلاوین است. در مورد منوآمین اکسیداز، یک آنزیم حاوی فلاوین، یک یون هیدرید از آمین برداشت می‌شود، ولی گیرنده نهایی الکترون‌ها اکسیژن ملکولی می‌باشد که منجر به تولید پراکسید هیدروژن می‌گردد.





شکل ۳۲-۱۰ ریبوفلاوین و فلاومین مونونوکلئوتید.

1. Rossmann fold
2. Prosthetic group



شکل ۳۳-۱۰ فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید.

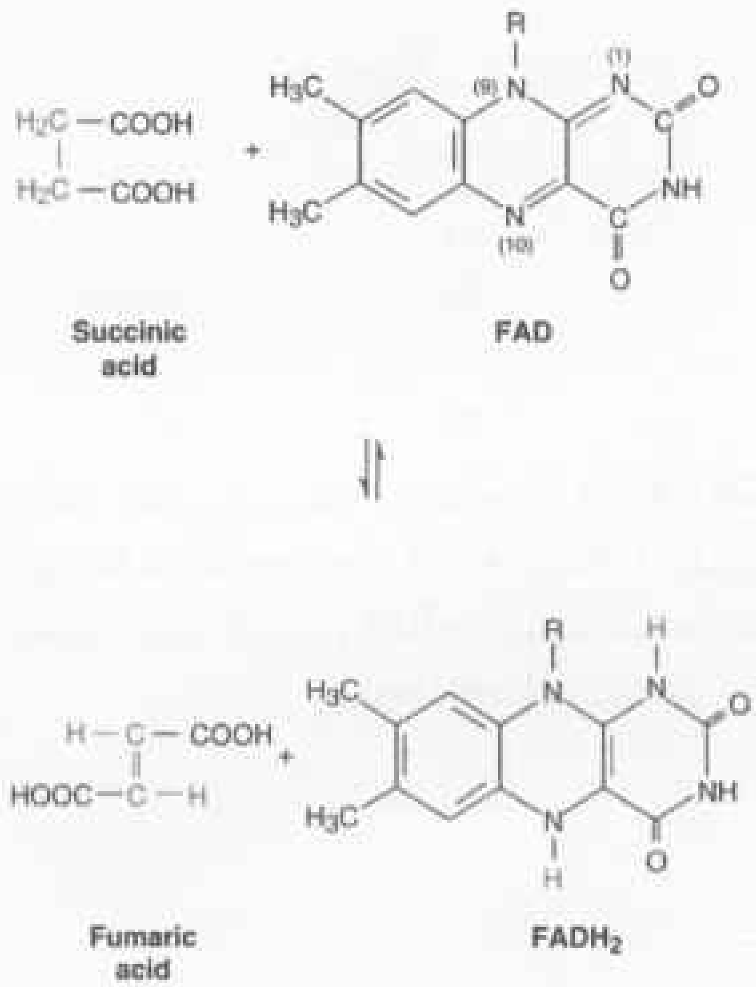
پیریدوکسال فسفات شکل کوآنزیمی پیریدوکسال است

پیریدوکسال فسفات (شکل ۳۵-۱۰) اساساً در واکنش‌های مربوط به اسیدهای آمینه همکاری دارد. ترانس‌آمیناسیون یکی از واکنش‌های اصلی است که از پیریدوکسال استفاده می‌کند؛ طی این واکنش (شکل ۴-۱۰ را ببینید) یک گروه آمینو در داخل ترکیب دیگری قرار داده می‌شود. پذیرنده یک گروه کربونیل نظیر یک α-کتو اسید و دهنده اسید آمینه‌ای نظیر گلوتامات یا آسپارتات است (شکل ۳-۱۹ را ببینید). اسید آمینه متصل به پیریدوکسال فسفات، این گروه آمینو را انتقال داده تا پیریدوکسامین متصل به آنزیم حاصل شود. بعد از جداشدن سوبسترای دهنده گروه آمینو از آنزیم، یک α-کتو اسید متفاوت وارد شده و گروه آمین از پیریدوکسامین به آن انتقال داده می‌شود. لذا پیریدوکسال مثالی از تغییر کوآنزیم طی واکنش و برگشت آن به حالت ابتدایی در انتهای واکنش می‌باشد.

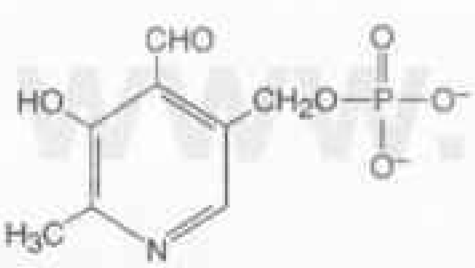
رزونانس حلقه پیریدینی کوآنزیم سبب تثبیت یک بار منفی در کربن α می‌شود. اساس واکنش این است که آلدئید بخش پیریدوکسالی از طریق یک باز شیف به اسید آمینه اتصال می‌یابد. بر روی این ترکیب واسط کووالان است که آنزیم برداشت گروه آمینو را کاتالیز می‌کند. یک جفت الکترون بر روی کربن باقی می‌ماند، و بار آنها توسط رزونانس حلقه پیریدوکسال تثبیت می‌شود. تولید نوروترانسمیترهای مهم دوپامین و سروتونین، نیاز به همکاری یک آنزیم حاوی پیریدوکسال فسفات دارد.

آدنوزین تری‌فسفات ممکن است سوبسترای دوم یا یک تعدیل‌کننده فعالیت باشد

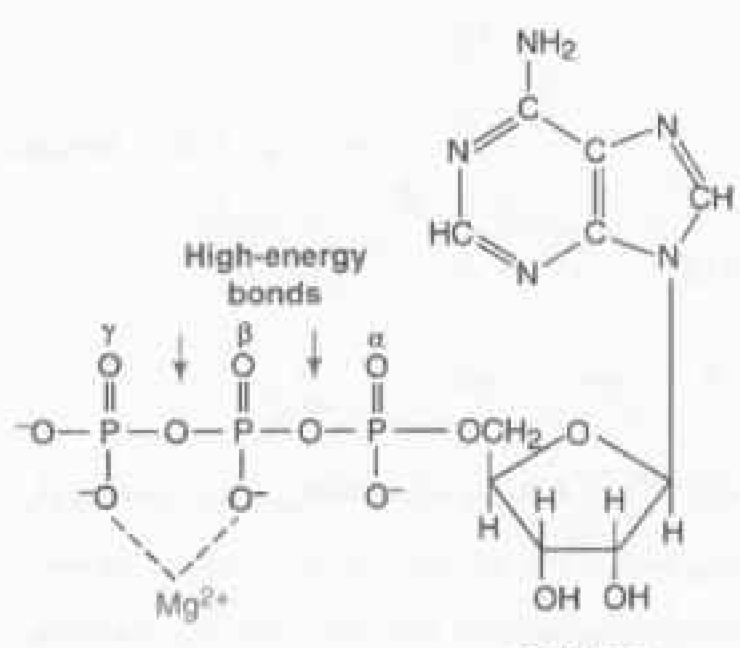
آدنوزین تری‌فسفات (ATP) (شکل ۳۶-۱۰) به عنوان یک کو-سوبسترا عمل می‌کند، ولی



شکل ۳۴-۱۰ FAD کوآنزیم موجود در واکنش سوکسینات دهیدروژناز است.



شکل ۳۵-۱۰ **پیریدوکسال فسفات.** پیریدوکسال فسفات به گروه آمینوی یک اسید آمینه اتصال یافته و به برداشت گروه R، H یا CO_2 اسید آمینه، کمک می‌کند.



شکل ۳۶-۱۰ **ساختمان ATP – Mg^{2+} اوروتات فسفو-ریبوزیل ترانسفراز.**

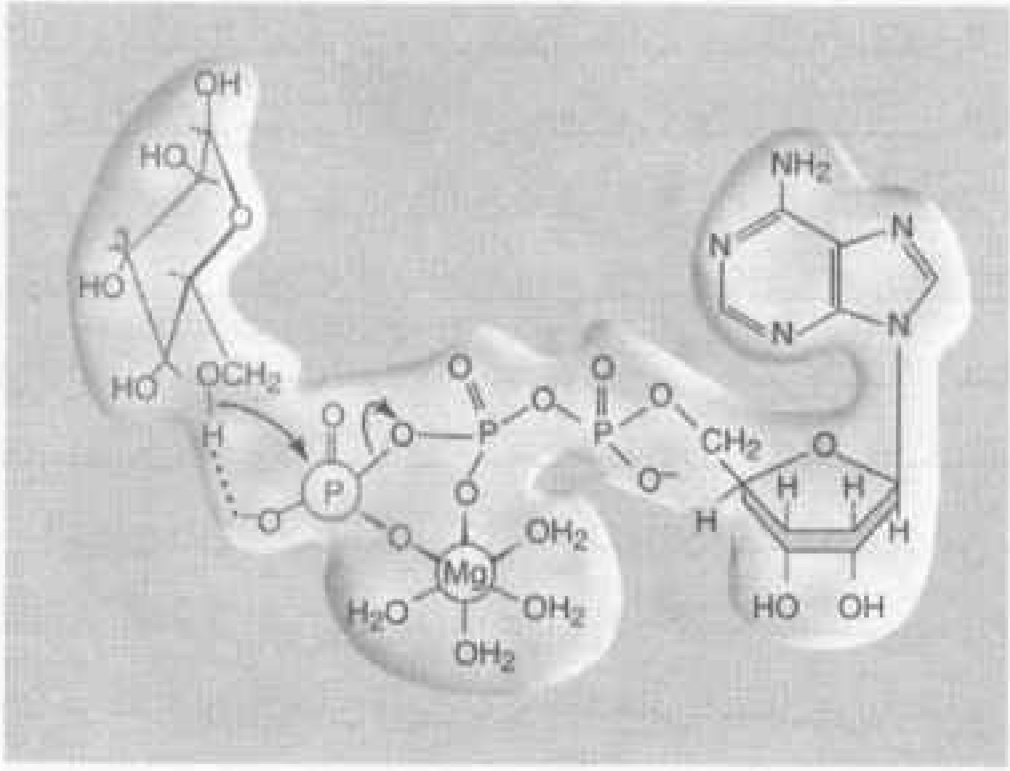
همچنین می‌تواند به‌عنوان یک کوفاکتور در تعدیل فعالیت برخی آنزیم‌ها باشد. این ترکیب در بیوشیمی نقش مرکزی دارد و در تمامی سلول‌های پستانداران سنتز می‌شود. انتهای دارای فعالیت بیوشیمیایی آن، تری‌فسفات واکنشگر است. پیوند انتهایی فسفات-اکسیژن انرژی آزاد بالای هیدرولیز را دارد که به‌معنی آن است که این فسفات می‌تواند از ATP به گروه‌های گیرنده دیگر انتقال داده شود. برای مثال، ATP به‌عنوان کو-سوبسترا توسط کینازها جهت انتقال فسفات انتهایی به پذیرنده‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. نمونه شاخص این واکنش‌ها توسط هگزوکیناز کاتالیز می‌شود (شکل ۴-۱۵ را ببینید).

ATP همچنین به‌عنوان یک تعدیل‌کننده فعالیت برخی آنزیم‌ها عمل می‌کند. این آنزیم‌ها جایگاه‌های اتصالی برای ATP دارند که اشغال آنها سبب تغییر در تمایل یا خاصیت واکنشگری آنزیم نسبت به سوبستراهای خود می‌شود. در این موارد، ATP یک **افکتور آلوستریک** است (ص ۵۶۲).

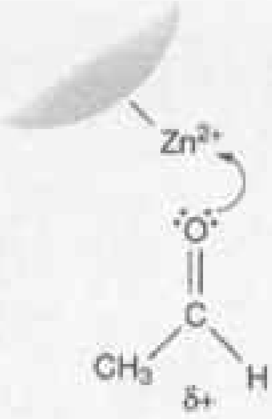
کوفاکتورهای یون فلزی

بسیاری از آنزیم‌ها برای فعالیت نیاز به یون‌های فلزی دارند. یون‌های فلزی یا یک نقش ساختمانی دارند و یا به‌عنوان یک اسید لویس (یک یون مثبت که می‌تواند به الکترون‌های جفت‌نشده اتصال یابد) یا یک پذیرنده/دهنده الکترون در واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء عمل کند. این یون‌ها مستقیماً به آنزیم یا سوبسترا اتصال می‌یابند. سوبسترای متصل به یون فلزی، سوبسترای واقعی برای واکنش است. در یکی از واکنش‌های بسیار معمول از یک یون Mg^{2+} متصل به یک نوکلئوزید تری‌فسفات استفاده می‌شود؛ یون فلزی متصل به فسفات‌ها سبب می‌شود تا یون فسفات مثبت‌تر شده و نسبت به حمله نوکلئوفیلیک حساس‌تر گردد (شکل ۳۷-۱۰).

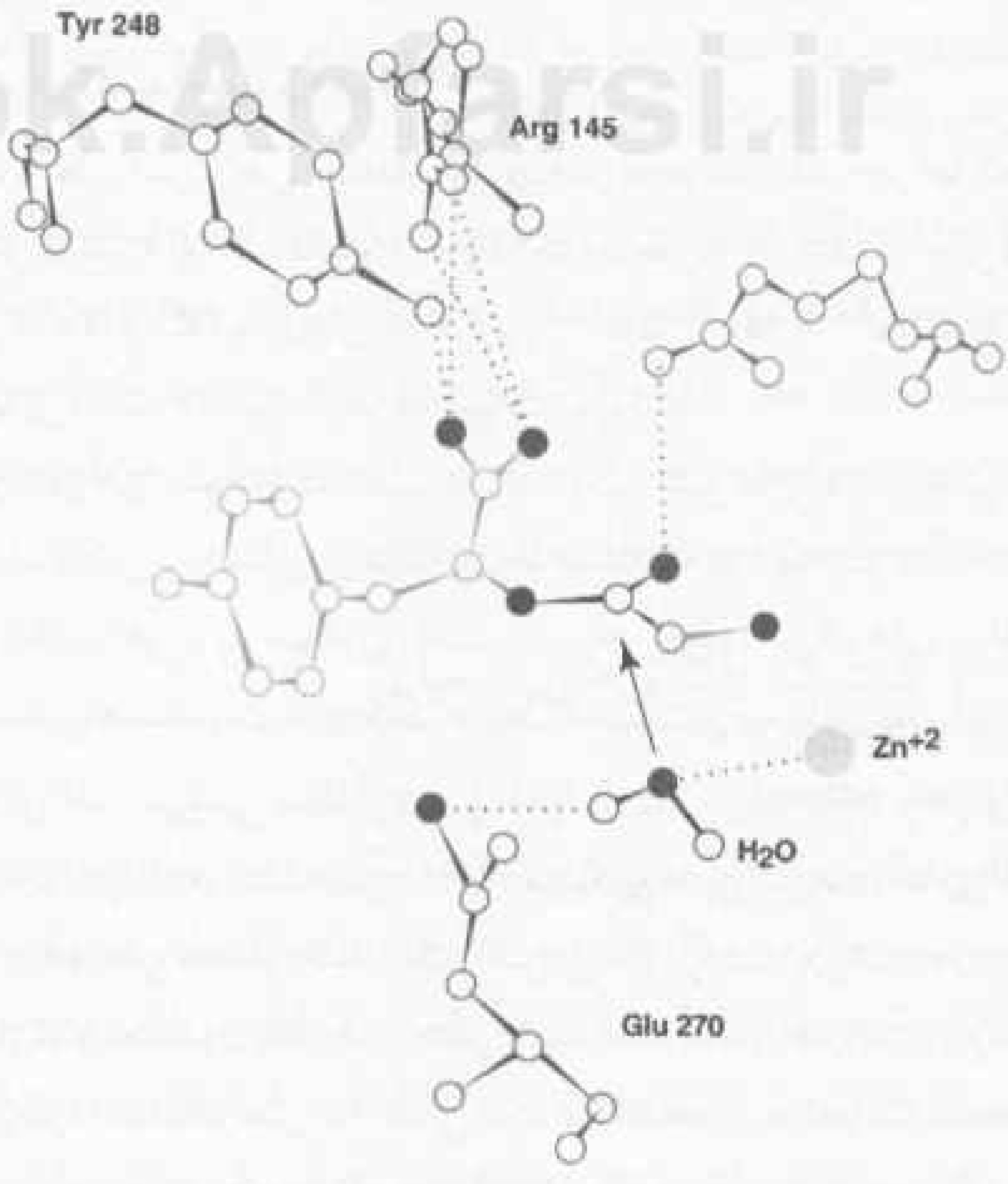
متالوآنزیم‌ها حاوی یک فلز انتقالی، نظیر Zn^{2+} یا Fe^{2+}، با اتصال محکم می‌باشند که اتصال سوبسترا را از طریق ایجاد یک کمپلکس با پل-فلزی تسهیل می‌کند. فلزات یا از طریق اتصال به سوبسترا و تسریع کاتالیز الکتروفیلیک (نوکلئوفیلیک) در محل تجزیه پیوند یا از طریق تثبیت ترکیبات واسط موجود در مسیر واکنش عمل می‌کنند. در الکل دهیدروژناز، یک Zn^{2+} متصل به آنزیم با اکسیژن در سوبسترا تعامل نموده و خصوصیات کربنی را تغییر می‌دهند که به آن اکسیژن اتصال می‌یابد (شکل ۳۸-۱۰). Zn^{2+} در کربوکسی پپتیداز و ترمولیزین که پروتئازهای دارای جایگاه‌های فعال یکسان هستند، در تولید یک گروه هیدروکسیل از آب و در جهت تثبیت حالت انتقالی حاصل از حمله این هیدروکسیل به پیوند پپتیدی عمل می‌کند. شکل ۳۹-۱۰ تولید هیدروکسیل جایگاه-فعال توسط Zn^{2+} را نشان می‌دهد. Glu ۲۷۰ به‌عنوان یک باز مورد نیاز برای برداشت پروتون از آب عمل می‌کند. تثبیت حالت انتقالی چهاروجهی توسط Zn^{2+} در شکل ۴۰-۱۰ نشان داده شده است. Zn^{2+} یک یون مخالف برای تثبیت اکسیژن منفی موجود بر روی کربن چهاروجهی فراهم می‌کند.



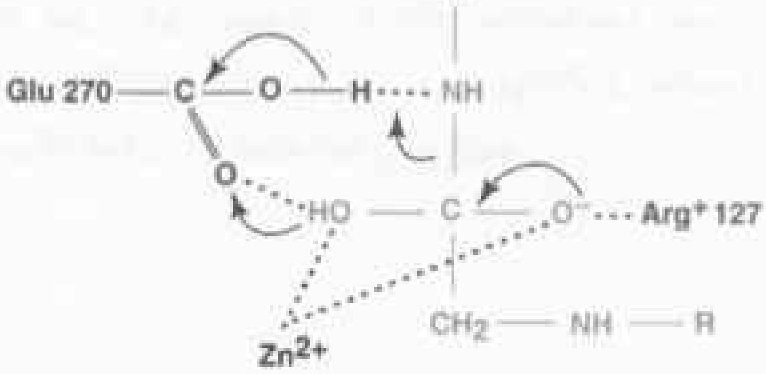
شکل ۳۷-۱۰ نقش Mg^{2+} به‌عنوان یک کمپلکس سوبسترا- پُل در جایگاه فعال کینازها. در هگزوکیناز، فسفات انتهای ATP به گلوکز انتقال یافته تا تولید گلوکز ۶-فسفات شود. Mg^{2+} با ATP کوئوردینانت شده تا تولید سوبسترای واقعی کند و ممکن است پیوند O — P انتهایی ATP را ناپایدار کند تا سبب تسهیل انتقال فسفات به گلوکز شود. جایگاه‌های اتصالی اختصاصی (آبی روشن) بر روی آنزیم (آبی تیره) برای گلوکز (بالا چپ به رنگ قرمز) و همچنین بخش‌های آدنینی و ریبوزی ATP (سیاه) وجود دارند.



شکل ۳۸-۱۰ اتصال یک کربونیل به Zn^{2+}. اتصال کربونیل یک آلدئید به Zn^{2+} منجر به ایجاد یک اتم کربن نسبتاً مثبت می‌شود که آمادگی بیشتری برای پذیرفتن یک یون هیدرید از NADH دارد.

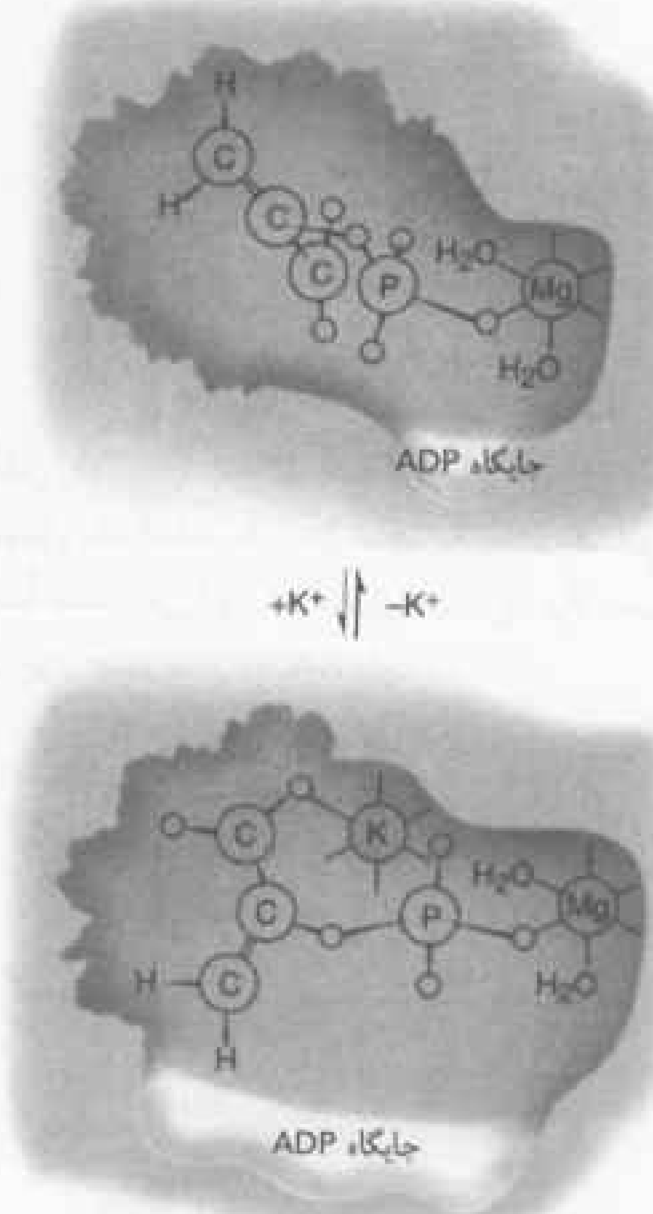


شکل ۴۰-۱۰ Zn^{2+} در مکانیسم واکنش کربوکسی پپتیداز A. Zn^{2+} متصل به آنزیم از آب اتصال‌یافته تولید یک هیدروکسیل نوکلئوفیل می‌کند که همان‌طور که با پیکان نشان داده شده است، به کربونیل پیوند پپتیدی حمله می‌کند. Glu 270 با کشاندن پروتون از آب متصل به روی، به این فرایند کمک می‌کند.



شکل ۳۹-۱۰ تثبیت حالت انتقالی ترکیب واسط چهار-وجهی توسط Zn^{2+}. بار مثبت موجود بر روی Zn^{2+} سبب تثبیت بار منفی موجود بر روی اکسیژن‌های کربن چهاروجهی در وضعیت انتقالی می‌شود. سپس همان‌طور که با پیکان‌ها نشان داده شده است، این ترکیب واسط چهاروجهی از بین می‌رود که نتیجه آن شکستن پیوند پپتیدی است.

علاوه بر نقش در اتصال به آنزیم و سوبسترا، فلزات همچنین ممکن است مستقیماً به آنزیم اتصال یافته تا کونفورماسیون فعال آن را تثبیت کنند یا شاید سبب القاء تولید یک جایگاه فعال شوند. Mn^{2+} و همچنین فلزات قلیایی دارای اتصال ضعیف (Na^+ یا K^+) چنین نقشی را دارند. در پیرووات کیناز، K^+ سبب القاء یک تغییر کونفورماسیونی ابتدایی می‌شود که برای تولید کمپلکس سه‌تایی لازم است، ولی کافی نمی‌باشد. با اتصال سوبسترا، K^+ تغییر کونفورماسیون دوم را در کمپلکس سه‌تایی دارای فعالیت کاتالیتیک القاء می‌کند که در شکل ۴۱-۱۰ نشان داده شده است. الکل دهیدروژناز پستانداران از این نظر بی‌همتا است که دو ملکول Zn^{2+} در هر زیرواحد دارد؛ یکی در کاتالیز شرکت کرده و دیگری نقش ساختمانی دارد. هر کدام از یون‌های فلزی به لیگاندهایی اتصال می‌یابند؛ در این حالت، این لیگاندها شامل زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه پروتئین هستند. برای مثال، Zn^{2+} به چهار لیگاند اتصال می‌یابد. در الکل دهیدروژناز، چهار اسید آمینه به Zn^{2+} ساختمانی اتصال دارند، در حالی‌که Zn^{2+} جایگاه فعال تنها سه اتصال به آب دارد یا سوبسترا به عنوان مورد چهارم عمل می‌کند. برخی ترکیبات نظیر یون آزید (N_3^-) یا منواکسید کربن (CO) به جایگاه اتصال به سوبسترای موجود بر روی فلزات اتصال می‌یابند و در نتیجه مانع اتصال آنزیم یا پروتئین به سوبسترای مناسب خود می‌شوند.

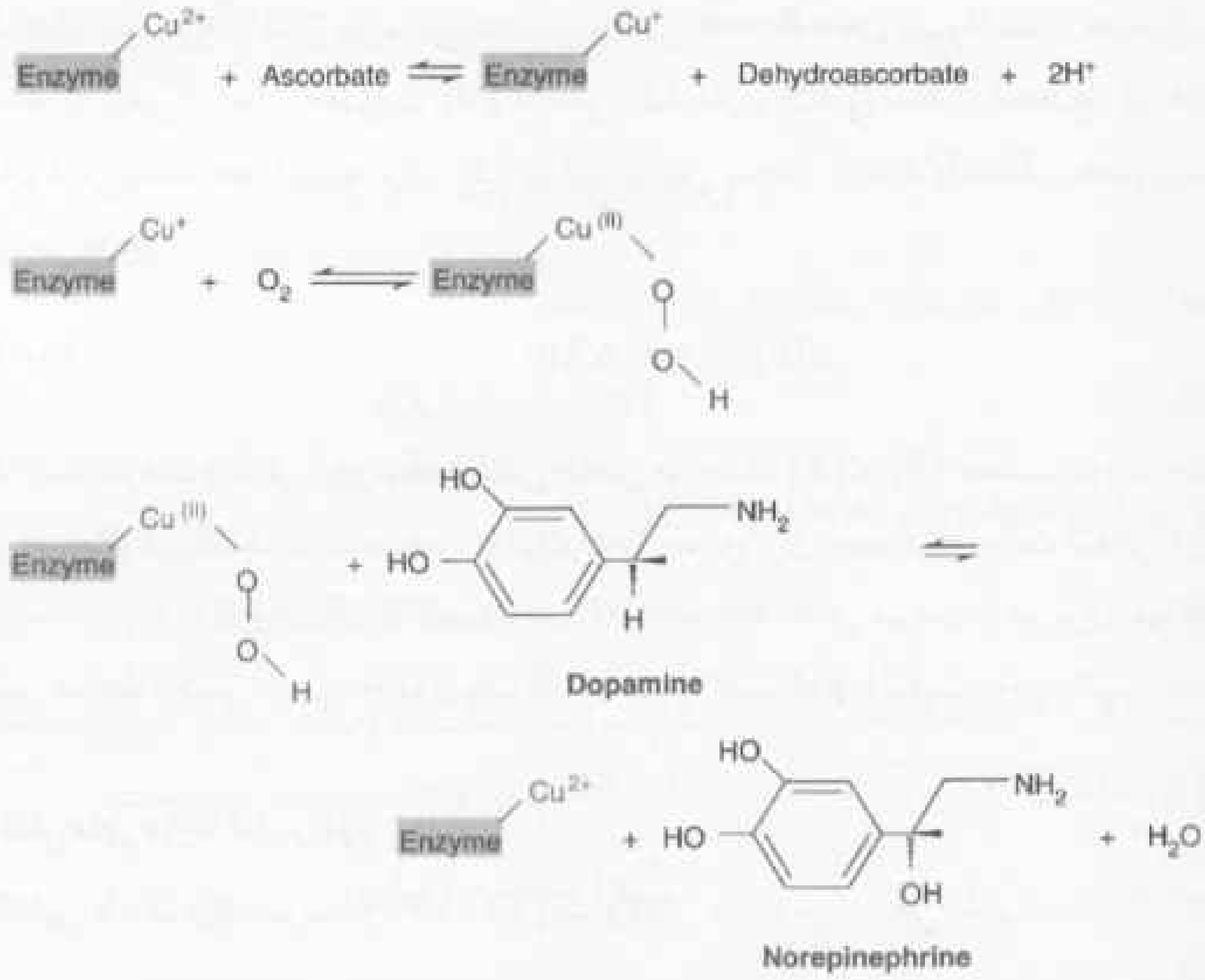


شکل ۴۱-۱۰ مدلی برای نقش K^+ در جایگاه فعال پیرووات کیناز. پیرووات کیناز این واکنش را کاتالیز می‌کند: پیرووات + ATP ← ADP + فسفوانول‌پیرووات. اتصال ابتدایی K^+ سبب القاء تغییرات کونفورماسیونی در این کیناز می‌شود که منجر به افزایش تمایل برای فسفوانول پیرووات می‌گردد. به‌علاوه، K^+ فسفوانول‌پیرووات را در موقعیت مناسب برای انتقال فسفات خود به ADP، دومین سوبسترا، قرار می‌دهد (نشان داده نشده است). Mg^{2+} سوبسترا را به جایگاه فعال آنزیم کوئوردینانت می‌کند. نتایج جدیدتر نشان می‌دهند که نقش دقیق یون‌های K^+ واقعاً شناخته‌شده نیست، ولی به‌نظر می‌رسد این یون سبب جهت‌گیری مناسب جایگاه فعال برای انجام کاتالیز می‌شود.

نقش فلزات در اکسیداسیون و احیاء

یون‌های فلزی نظیر مس و آهن که تعداد الکترون‌های موجود در مدار آخر آنها کامل نیست، می‌توانند طی واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء الکترون بگیرند یا بدهند، در حالی‌که یون‌های یک ظرفیتی (Na^+ و K^+) یا یون‌های دو ظرفیتی (Zn^{2+}، Mg^{2+} یا Ca^{2+}) که لایه الکترونی خارجی آنها پر است، در این واکنش‌ها شرکت نمی‌کنند.

پروتئین‌های آهن-سولفور که اغلب تحت عنوان پروتئین‌های آهن غیرهِمی مورد اشاره قرار می‌گیرند، کلاس بی‌همتایی از متالوآنزیم‌ها هستند که در آنها مرکز فعال حاوی یک یا چند دسته شلات آهن با پل سولفوری است. در برخی موارد، این اتم‌های سولفور مربوط به فقط سیستئین هستند و در موارد دیگر مربوط به سیستئین و سولفور یونی آزاد می‌باشند. این آنزیم‌های آهن غیرهِمی منطقاً پتانسیل احیاء (E_0') پایینی دارند و در واکنش‌های انتقال الکترون شرکت می‌کنند (ص ۷۶۱). **سیتوکروم‌ها** پروتئین‌های حاوی آهن هِمی هستند که در آنها آهن متحمل انتقال یک الکترونی قابل‌برگشت می‌شود. در برخی موارد، هِم از طریق کوئوردیناسیون زنجیرهای جانبی اسید آمینه به آهن هِم، به آپوپروتئین اتصال دارد. لذا این فلز نه تنها یک نقش ساختمانی دارد، بلکه همچنین در حوادث شیمیایی شرکت می‌کند. مس و آهن همچنین در فعال‌سازی اکسیژن ملکولی نقش دارند. مس یک عامل فعال شرکت‌کننده در چندین اکسیداز و هیدروکسیلاز است. برای مثال، دوپامین β - هیدروکسیلاز، ارائه یک اتم اکسیژن از O_2 به‌داخل دوپامین در جهت تولید نوراپی‌نفرین را کاتالیز می‌کند



شکل ۴۲-۱۰ نقش مس در فعال‌سازی اکسیژن ملکولی توسط دوپامین هیدروکسیلاز. شکل کوپریک طبیعی آنزیم نسبت به اکسیژن واکنشگر نیست، ولی به دنبال احیاء توسط کوسوبسترا، یعنی آسکوربات، تولید یک رادیکال اکسیژن واکنشگر متصل به مس آنزیم می‌شود که بعداً با دوپامین واکنش نموده تا تولید نوراپی‌نفرین و یک آنزیم حاوی مس غیرفعال گردد.

(شکل ۴۲-۱۰). جایگاه فعال این آنزیم حاوی یک اتم یون کوپرو است که در واکنش با اکسیژن تولید یک کمپلکس اکسیژن–مس فعال‌شده می‌کند. معتقدند کمپلکس مس–هیدروپراکسید به گونه مس $(II) - O_2$ تبدیل می‌شود که به‌عنوان یک اکسیژن فعال در هیدروکسیلاسیون دوپا عمل می‌کند. گونه‌های دیگر اکسیژن فعال در متالوآنزیم‌ها تولید شده و برای هیدروکسیلاسیون مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۶-۱۰ • کینتیک واکنش‌های شیمیایی

سرعت تولید محصول

سرعت تمامی واکنش‌های شیمیایی را می‌توان به شکل ریاضی بیان نمود. در هنگام تهیه معادلات سرعت، تولید محصول یا ناپدیدشدن مواد واکنشگر را می‌توان تعیین نمود؛ در اکثر مواقع، تولید محصول اندازه‌گیری می‌شود. براساس ارتباطات ریاضی بین سرعت(های) تولید محصول(ها) (تحت عنوان **سرعت**[1]) به‌عنوان تابعی از غلظت سوبسترا(ها)، برخی جنبه‌های مکانیسم کاتالیز آنزیمی را می‌توان تعیین نمود. یک معادله برای بیان سرعت تولید محصول در هر واکنشی شامل یک ثابت سرعت (k) و غلظت تمامی سوبستراهایی

1. Velocity

است که طی دوره واکنش تغییر می‌کنند. در واکنش $A+B \rightarrow P$، تغییر غلظت محصول به عنوان تابعی از زمان به صورت $d[P]/dt$ می‌باشد که در آن [P] غلظت محصول در هر زمان t می‌باشد. معادله پایه برای برقراری ارتباط بین سرعت و مواد واکنشگر به صورت زیر می‌باشد

$$d[P]/dt = k[A][B] \qquad (۱۰-۲)$$

k ثابت سرعت و ثابتی برای یک واکنش خاص می‌باشد. [A] و [B] غلظت سوبستراها در هر زمان می‌باشند. ثابت سرعت با انرژی فعال‌سازی برای رسیدن به حالت انتقالی در ارتباط است و با افزودن یک کاتالیست تغییر می‌کند. ثابت‌های سرعت را می‌توان تنها با تغییر شرایط واکنش، یعنی، افزودن یک کاتالیست یا تغییر pH یا ترکیب یونی، تغییر داد.

واکنش‌های درجه اول و دوم

واکنشی با تنها یک سوبسترا ($A \rightarrow P$) یک واکنش درجه-یک[1] می‌باشد که در آن

$$d[P]/dt = k[A] \qquad (۱۰-۳)$$

در صورتی که دو سوبسترا وجود داشته باشد، واکنش از نوع درجه-دوم می‌باشد (معادله ۲-۱۰). واحد k معادلات مربوط به یک واکنش درجه اول و دوم متفاوت هستند. از آنجایی که $d[P]/dt$ واحد مول در دقیقه (یا هر واحدی از غلظت یا زمان) را دارد، k در معادله ۲-۱۰ واحد l/moles×min خواهد داشت، ولی در معادله ۳-۱۰ این واحد l/min می‌باشد. در صورتی که دو ملکول ترکیب A تولید محصول P می‌کنند، آنگاه معادله درجه دوم خواهد بود، زیرا سرعت تولید P با واکنش $[A]+[A]$ ارتباط دارد. معادله $d[P]/dt$ برابر $k[A][A]$ یا $k[A]^2$ خواهد بود که همانند یک واکنش درجه-دوم، حتی با درگیری تنها یک ترکیب، می‌باشد. برای $d[P]/dt = k[A][B]$، واکنش از نظر A یا B از نوع درجه-اول، ولی در مجموع از نوع درجه-دوم می‌باشد.

عبارات غلظت موجود در معادله تنها برای سوبستراهایی هستند که غلظت آنها طی دوره واکنش تغییر می‌کند. در واکنش‌هایی که در آنها آب نقش دارد، غلظت آب دستخوش تغییر نمی‌شود (یا قابل اندازه‌گیری نیست). لذا در صورتی که B در واکنش $A+B \rightarrow C$ آب باشد، میزان B ثابت بوده و واکنش از نوع درجه اول است (معادله ۳-۱۰).

سرعت ناپدیدشدن سوبسترا

برای واکنش ساده $A \rightarrow P$، سرعت واکنش را همچنین می‌توان براساس کاهش سوبسترا نسبت به زمان، $-d[A]/dt$، بیان نمود. علامت منها لازم است، زیرا غلظت A طی زمان

1. First-order

کاهش می‌یابد. تغییر در غلظت محصول P نسبت به زمان برابر $d[\mathrm{P}]/dt$ است که معادل کاهش سوبسترا یا $-d[\mathrm{A}]/dt$ می‌باشد.

$$d[\mathrm{P}]/dt=-d[\mathrm{A}]/dt=k[\mathrm{A}] \qquad (۱۰-۴)$$

معادله کاهش سوبسترا نسبت به زمان عبارتست از

$$d[\mathrm{A}]/dt=-k[\mathrm{A}] \qquad (۱۰-۵)$$

و اینتگرال dA/A برابر ln A می‌باشد که

$$\ln[\mathrm{A}]=2.3\log[\mathrm{A}]=-kt+\text{constant} \qquad (۱۰-۶)$$

معادله ۶-۱۰ ارتباط ریاضی برای کاهش سوبسترا نسبت به زمان می‌باشد. در زمان صفر، [A] غلظت ابتدایی $[\mathrm{A}_0]$ است، لذا معادله را می‌توان به صورت زیر نوشت

معادله
$$\ln[\mathrm{A}]=-kt+[\mathrm{A}]_0$$

بنابراین

$$\ln[\mathrm{A}/\mathrm{A}_0]=-kt \qquad (۱۰-۷)$$

یا

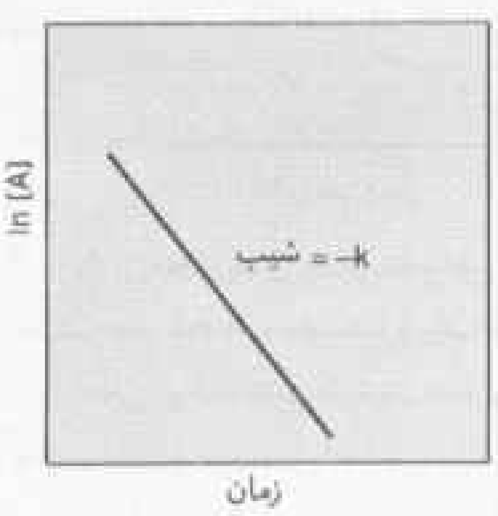
$$2.3\log[\mathrm{A}/\mathrm{A}_0]=kt$$

نمودار ln[A] در برابر زمان خط مستقیمی با شیب $k-$ می‌باشد (شکل ۴۳-۱۰).

برای مقایسه، اغلب از واژه نیمه-عمر استفاده می‌شود. نیمه-عمر ($t_{1/2}$ یا $t_{50\%}$) مدت زمان مورد نیاز برای تبدیل ۵۰٪ سوبسترا به محصول می‌باشد. از آنجایی که میزان $[\mathrm{A}/\mathrm{A}_0]$ برابر ۰٫۵ و ln(۰٫۵) برابر ۰٫۶۹ − می‌باشد، داریم

$$-0.69=-kt_{50\%} \qquad (۱۰-۸)$$

به عبارت دیگر، نیمه-عمر برابر $0.69/k$ می‌باشد. لذا هر چه ثابت سرعت بزرگتر باشد، طی واکنش با سرعت بیشتری نیمی از سوبسترا مصرف می‌شود. زوال رادیواکتیو و همچنین واکنش‌های شیمیایی تحت شرایط خاص، مثال‌هایی از واکنش درجه-اول هستند.



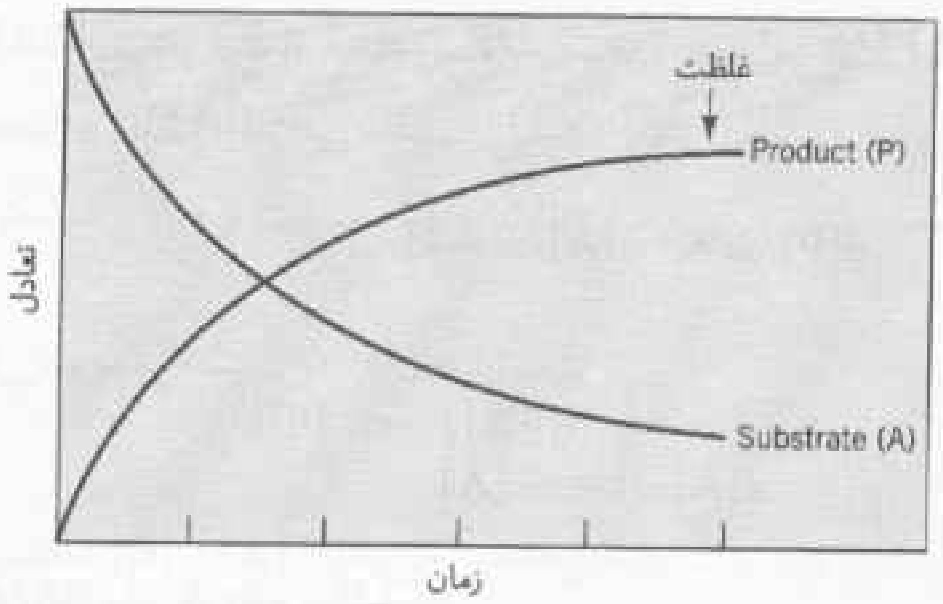
شکل ۴۳-۱۰ **نموداری از ln[A] در برابر زمان برای یک واکنش درجه- اول.**

واکنش‌های قابل‌برگشت

بسیاری از واکنش‌ها قابل برگشت هستند. یعنی

$$\mathrm{A}\underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}}\mathrm{P}$$

می‌توان معادله سرعت تولید P یا ماده شروع‌کننده A را نوشت.



شکل ۴۴-۱۰ نمودار ناپدیدشدن سوبسترا و ظهور محصول. به دلیل وجود واکنش برگشت‌پذیر، در حالت تعادل، هیچ محصول و سوبسترایی خالصی تولید نمی‌شود.

$$d[\mathrm{P}]/dt = k_1[\mathrm{A}] - k_2[\mathrm{P}] \quad (۱۰-۹)$$

$$d[\mathrm{A}]/dt = k_2[\mathrm{P}] - k_1[\mathrm{A}] \quad (۱۰-۱۰)$$

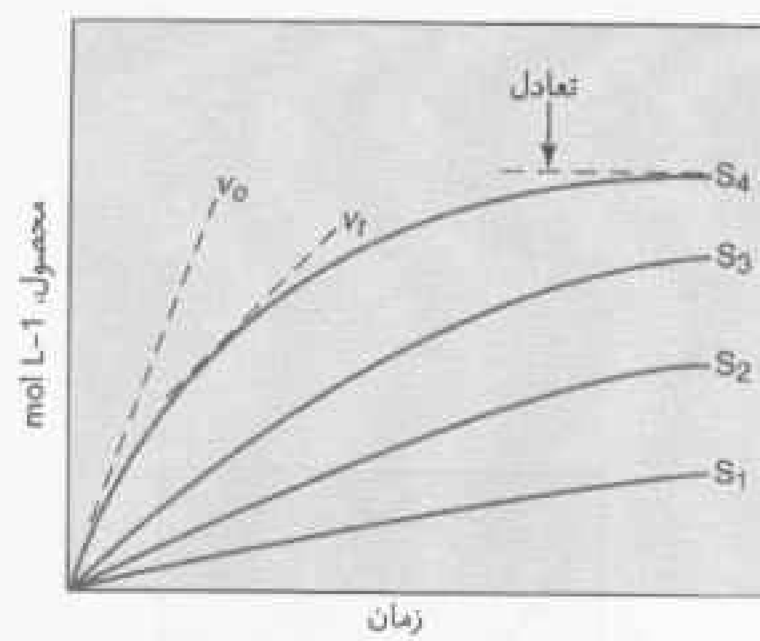
در حالت تعادل که در آن تغییری در غلظت اجزاء وجود ندارد، سرعت تولید یک جزء برابر سرعت تولید جزء دیگر است. شکل ۴۴-۱۰ نمودار کاهش سوبسترا و تولید محصول است. معادله سرعت برای تولید محصول انعکاسی از میزان ماده در حال تولید ($k_1[\mathrm{A}]$) است، ولی با تبدیل دوباره به ماده شروع‌کننده ($-k_2[\mathrm{P}]$)، محصول کاهش می‌یابد. علامت منفی نشان می‌دهد که ماده مورد نظر برداشت می‌گردد. معادله مشابهی را می‌توان برای تغییر ماده شروع‌کننده نوشت. از آنجایی‌که در حالت تعادل داریم

$$d[\mathrm{P}]/dt = d[\mathrm{A}]/dt \quad (۱۰-۱۱)$$

یا

$$k_1[\mathrm{A}] = k_2[\mathrm{P}] \Rightarrow k_1/k_2 = [\mathrm{P}]/[\mathrm{A}] \quad (۱۰-۱۲)$$

نسبت k_1/k_2 ثابت تعادل یا K_{eq} و برابر $[\mathrm{P}]/[\mathrm{A}]$ می‌باشد. با وجود این که ثابت‌های سرعت مجزا برای یک واکنش قابل برگشت، مستقل از ثابت تعادل هستند، نسبت ثابت‌ها تحت تأثیر ثابت تعادل قرار دارد. ثابت تعادل خود وابسته به تفاوت انرژی آزاد مورد نیاز برای تبدیل A به P (تحت عنوان گرمای تولید) می‌باشد. کینتیک واکنش‌های مرکب در یک نگاه دقیق‌تر ۴-۱۰ آورده شده است.



شکل ۴۵-۱۰ منحنی‌های پیشرفت برای یک واکنش آنزیمی در غلظت‌های مختلف سوبسترا و یک غلظت ثابت آنزیم. سرعت ابتدایی (v_0) واکنش از شیب منحنی پیشرفت در ابتدای واکنش تعیین می‌شود. با افزایش غلظت سوبسترا (S1-S4)، سرعت ابتدایی افزایش می‌یابد، ولی این سرعت به یک میزان محدود برای هر آنزیم مشخص می‌رسد. سرعت در هر زمان t به صورت v نشان داده می‌شود.

۷-۱۰ • کینتیک واکنش‌های تک-سوبسترایی

یک واکنش آنزیمی همانند یک واکنش درجه-دوم است. لذا همان‌طور که در شکل ۴۵-۱۰ نشان داده شده است، در غلظت ثابت آنزیم، با افزایش غلظت سوبسترا، سرعت واکنش بیشتر می‌شود. طی دوره واکنش، به دلیل کاهش میزان سوبسترا یا آغاز تجمع محصول،

یک نگاه دقیق‌تر ۴-۱۰

واکنش‌های مرکب

جایگزینی نوکلئوفیلی یک واکنش معمولی است که در واکنش‌های بیوشیمیایی رخ می‌دهد. شکل عمومی این واکنش به این صورت است:

$$R-X+Y \rightarrow Y-R+X$$

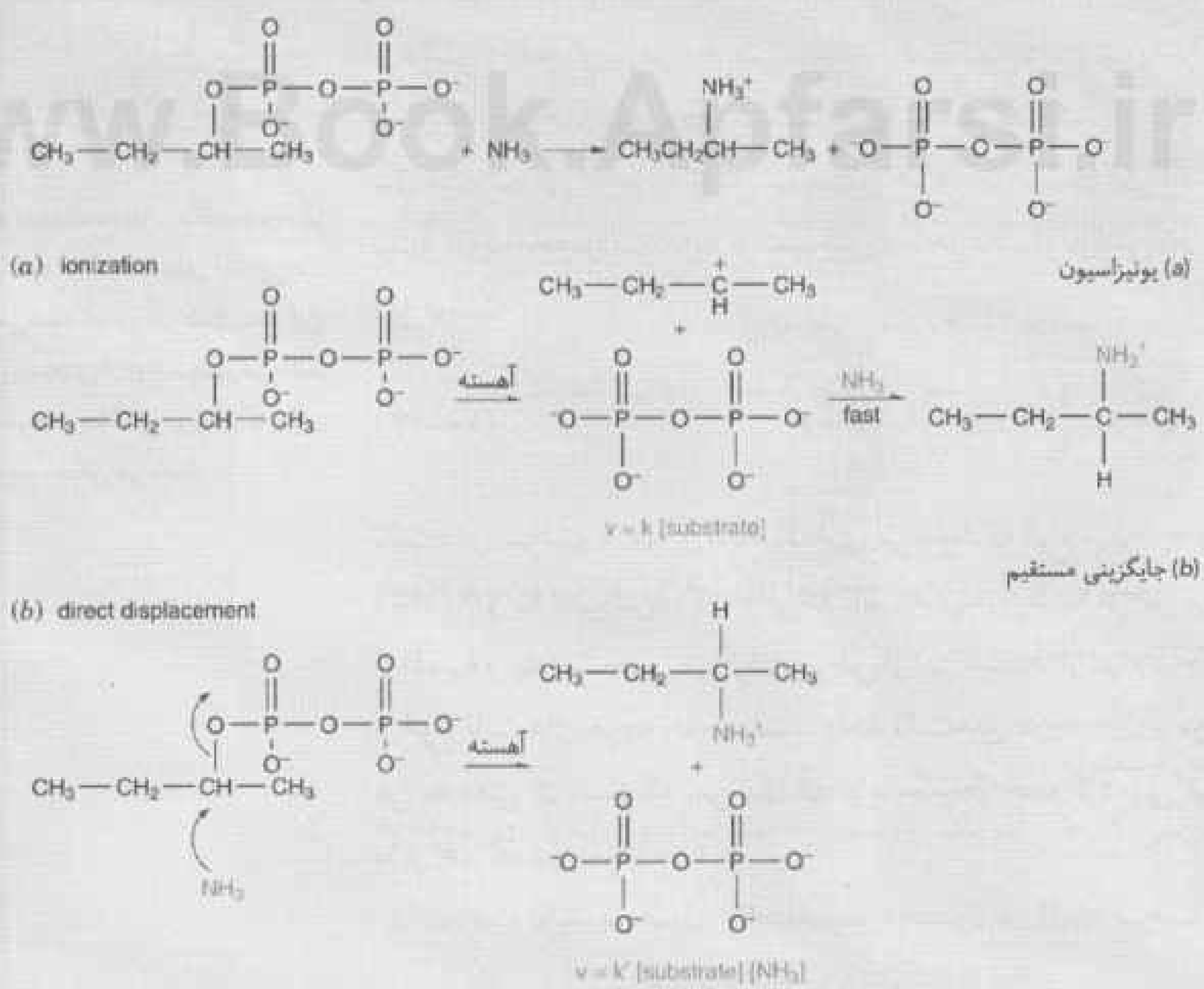
(که در آن R قسمتی از یک ترکیب آلی است و X یا Y اشاره به اجزایی نظیر گروه الکلی یا آمینو دارند). این واکنش می‌تواند به دو شکل متفاوت انجام شود که هر کدام معادله سرعت متفاوتی دارد.

احتمال اول این است که ترکیب R−X تفکیک شده و تولید $R^+ + X^-$ کند. سپس Y می‌تواند به R^+ حمله کرده تا محصول نهایی، R−Y، تولید شود. احتمال دوم این است که Y با حمله مستقیم به R−X، جایگزین X شده و همان محصول نهایی را تولید کند. معادلات کینتیکی این دو واکنش متفاوت هستند.

سرعت اولین مرحله در واکنش تبدیل R−X به R^+ و X^- برابر است با

$$d[R-X]/dt=-k[RX]$$

برای نیمه دوم واکنش، $R^+ + Y$، سرعت براساس $k'[R^+][Y]$ تعیین می‌شود. در صورتی‌که اولین مرحله در مقایسه با مرحله دوم، بسیار آهسته باشد، آنگاه سرعت کل تنها توسط اولین مرحله تعیین می‌شود. در کینتیک، تنها مراحل آهسته اندازه‌گیری می‌شوند. برای توجیه، تصور کنید R−X با سرعت $10\mu M/min$ به $X^- + R^+$ تبدیل می‌شود و حمله Y به R^+ با سرعت $1000\mu M/min$ انجام می‌شود. لذا وقتی یک ملکول R^+ تولید می‌شود، با سرعت بسیار زیاد به محصول نهایی تبدیل می‌گردد. افزایش سرعت سریع‌ترین مرحله تغییری در سرعت تولید محصول به‌وجود نمی‌آورد، زیرا نمی‌تواند سریع‌تر از سرعت آهسته‌ترین مرحله تولید شود. این به آن



واکنش‌های جایگزینی نوکلئوفیلی. (a) مکانیسم یونیزاسیون. (b) مکانیسم جایگزینی مستقیم. توجه داشته باشید که در مکانیسم یونیزاسیون، سرعت واکنش تابعی از غلظت تنها یک سوبسترا می‌باشد، در حالی که در جایگزینی مستقیم سرعت وابسته به غلظت هر دو سوبسترا است.

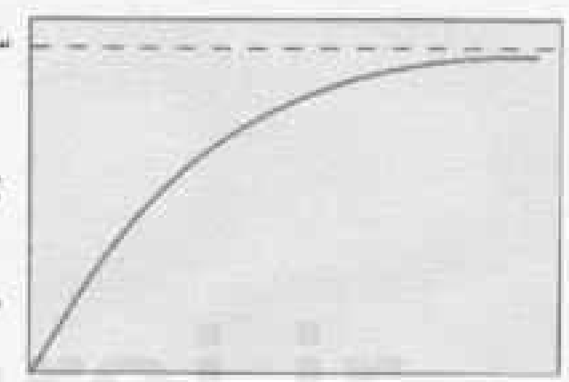
یک نگاه دقیق‌تر ۴-۱۰ (ادامه)

معنی است که تولید محصول با معادله سرعت:

$$d[\mathrm{R}-(-\mathrm{X})]/dt=-k_1[\mathrm{RX}]$$

شرح داده می‌شود. این واکنش غیروابسته به غلظت جزء Y می‌باشد. یعنی، واکنش از نوع درجه- یک است. می‌توان گفت که واکنش نسبت به [Y] از نوع درجه- صفر است، یعنی واکنش وابسته به غلظت Y نیست. ($[\mathrm{Y}]^0=1$ را به‌یاد آورید.) افزایش غلظت Y اثری بر روی سرعت واکنش نخواهد داشت. در واکنش حمله Y به R-X، معادله سرعت شامل غلظت هر دو سوبسترا می‌باشد. یعنی، $d[\mathrm{R}-\mathrm{X}]/dt=-k_2[\mathrm{R}-\mathrm{X}][\mathrm{Y}]$، که یک واکنش درجه- دوم مرسوم است. تفاوت اصلی بین این دو مسیر واکنش این است که آهسته‌ترین مرحله در یکی مستلزم وضعیت انتقالی تبدیل R-X به $\mathrm{R}^+ + \mathrm{X}^-$ می‌باشد. در دیگری، مرحله انتقالی مستلزم حمله Y به R-X می‌باشد (شکل ۴۵-۱۰). دوباره، کینتیک به ما در مورد مراحل آهسته‌تری می‌گوید که طی واکنش رخ می‌دهند. آهسته‌ترین مرحله‌ای که در یک واکنش آنزیمی رخ می‌دهد را مرحله محدودکننده-سرعت گویند.

کینتیک واکنش مرکب در هنگام پایش جریان ترکیبات در یک مسیر متابولیکی رخ می‌دهد. سرعت آهسته‌ترین مرحله، سرعت تولید محصول را تعیین خواهد کرد.



شکل ۴۶-۱۰ نمودار سرعت در برابر غلظت سوبسترا برای یک واکنش آنزیمی. نمودار سرعت‌های ابتدایی در غلظتی از سوبسترا رسم می‌شود که در آن غلظت‌ها، این سرعت‌ها تعیین شده‌اند. این منحنی از نوع سهمی می‌باشد که به‌طور مماس به یک سرعت حداکثر می‌رسد که برای یک میزان مشخص از آنزیم ممکن می‌باشد.

سرعت کاهش می‌یابد. با فرض برگشت‌پذیری واکنش، این واکنش به تعادل خواهد رسید. با محاسبه سرعت ابتدایی (v_0) (یعنی، سرعت قبل از شروع تجمع محصول) واکنش در غلظت‌های مختلف سوبسترا، می‌توان منحنی شکل ۴۶-۱۰ را به‌دست آورد. در غلظت‌های بالای سوبسترا، سرعت نسبت به سوبسترا از نوع درجه صفر خواهد شد. به عبارت دیگر، با افزایش [S] دیگر سرعت افزایش نخواهد یافت. زیرا آنزیم و سوبسترا کمپلکسی را به‌وجود می‌آورند و سرعت تولید محصول متناسب با غلظت کمپلکس است. در غلظت‌های بالای سوبسترا، تمامی آنزیم به شکل کمپلکس خواهد بود. با جدایی برگشت‌پذیر سوبسترا یا تبدیل آن به محصولات، آنزیم از کمپلکس آزاد خواهد شد. واکنش کلی را می‌توان به صورت زیر نوشت

$$\mathrm{E}+\mathrm{S}\underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}}\mathrm{ES}\xrightarrow{k_3}\mathrm{E}+\mathrm{P} \qquad (۱۰-۱۳)$$

ثابت‌های سرعت k طوری شماره‌گذاری می‌شوند که انواع مربوط به محصولات اعداد فرد (k_1، k_3 و k_5) می‌گیرند، در حالی که ثابت‌های مربوط به مراحل برگشت با اعداد زوج (k_2، k_4 و k_6) مشخص می‌گردند؛ برخی از این ثابت‌ها از انواع درجه-اول و برخی دیگر از انواع ثابت‌های درجه-دوم هستند. واحد ثابت‌های درجه-اول و دوم متفاوت می‌باشند، این به معنی آن است که نمی‌توان آنها را با یکدیگر جمع کرد، ولی می‌توان در هم ضرب یا بر هم تقسیم نمود.

سرعت تولید محصول، حاصلضرب محصول در ثابت سرعت می‌باشد.

$$d[\mathrm{P}]/dt=k_3[\mathrm{ES}] \qquad (۱۰-۱۴)$$

برای تعیین سرعت تولید محصول، لازم است میزان ES را به صورت تابعی از غلظت

یک نگاه دقیق‌تر ۵-۱۰

اقتباس معادله میکائیلیس- مِنتِن

برای اقتباس معادله میکائیلیس- منتن، تعیین غلظت ES لازم است. سرعت تولید ES توسط $k_1[E_f][S]$ تعیین می‌شود که در آن $[E_f]$ غلظت آنزیم آزاد می‌باشد. مصرف ES با دو واکنش تعیین می‌شود: برگشت ES به ماده شروع‌کننده توسط $k_2[ES]$، و تبدیل ES به محصولات توسط $k_3[ES]$. با ترکیب این عبارات، معادله‌ای به دست می‌آید که تغییر در غلظت ES را نشان می‌دهد.

$$d[ES]/dt = k_1[E_f][S] - k_2[ES] - k_3[ES]$$

با فرض اینکه غلظت ES، به غیر از چند میلی‌ثانیه ابتدایی بعد از تماس سوبسترا و آنزیم، ثابت می‌باشد، آنگاه $d[ES]/dt = 0$. این را فرض حالت- پایدار گویند که اشاره به غلظت ES طی دوره زمانی ابتدایی واکنش آنزیمی (دوره اندازه‌گیری سرعت ابتدایی) دارد. اعتبار شرایط حالت- پایدار را می‌توان به طریق ریاضی به اثبات رساند. با جایگزینی $[E_f]$ با $[E_t]-[ES]$ که در آن E_t غلظت کل آنزیم است، و با نوآرایی خواهیم داشت

$$k_1([E_t]-[ES])[S] = (k_2+k_3)[ES]$$

با حل معادله برای $[ES]$ خواهیم داشت

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{(k_2+k_3)+k_1[S]}$$

از آنجایی‌که سرعت تولید (v) واکنش برابر $k_3[ES]$ است، با ضرب معادله فوق در k_3 داریم

$$v = \frac{k_3 k_1[E_t][S]}{(k_2+k_3)+k_1[S]}$$

برای تبدیل این معادله به معادله میکائیلیس-منتن، صورت و مخرج بر k_1 تقسیم می‌شوند.

$$v = \frac{k_3[E_t][S]}{(k_2+k_3)/k_1+[S]} \quad \text{یا} \quad v = \frac{V_m[S]}{K_m+[S]}$$

معادله k_3E_t سرعت حداکثر واکنش (V_m) در زمانی است که تمامی آنزیم به شکل ES باشد و به‌همین دلیل، k_3 برابر k_{cat} می‌باشد. ثابت‌های موجود در مخرج به عنوان K_m تعریف می‌شوند. واضح است که K_m یک ثابت تفکیک ساده نیست. در صورتی‌که k_3 در مقایسه با k_2 بسیار کوچک باشد، آنگاه نسبت حاصل برابر k_2/k_1 خواهد بود که K_d یا ثابت تفکیک می‌باشد.

آنزیم و سوبسترا بدست آورد. معادله ۱۴-۱۰ را می‌توان برای سرعت واکنش حل نمود (یک نگاه دقیق‌تر ۵-۱۰ را برای اقتباس این معادله ببینید). شکل نهایی عبارتست از

$$v = \frac{k[E][S]}{K+[S]} \qquad (۱۰-۱۵)$$

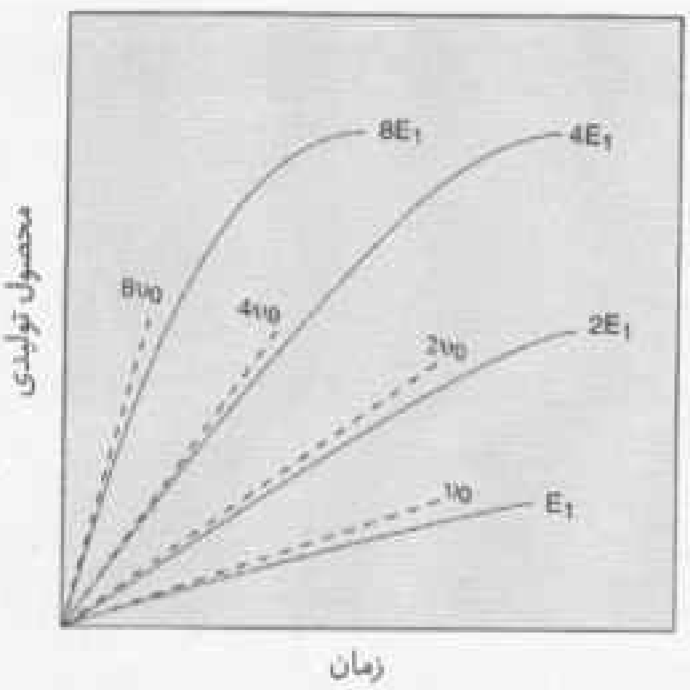
که در آن k یک ثابت سرعت و K ثابتی است که شامل ثابت‌های سرعت مجزای مرتبط با تعامل سوبسترا با آنزیم می‌باشد.

معادله میکائیلیس-مِنتِن

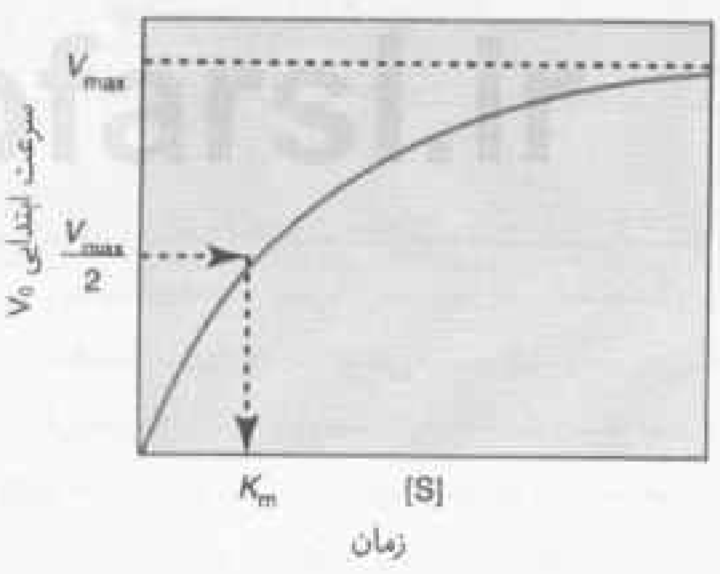
ساده‌ترین واکنش آنزیمی که طی آن یک سوبسترا به یک محصول تبدیل می‌شود، به صورت زیر است

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_4}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (۱۰-۱۶)$$

در صورتی‌که واکنش در معادله ۱۶-۱۰ اساساً غیرقابل‌برگشت باشد ($k_4 = ۰$ یا $[P]$ وجود ندارد که این حالت در ابتدای مخلوط نمودن آنزیم و S مشاهده می‌گردد)، معادله



شکل ۴۷-۱۰ منحنی‌های پیشرفت در غلظت‌های مختلف آنزیم و غلظت‌های اشباع‌کننده سوبسترا. سرعت ابتدایی (v_0) با دوبرابر شدن غلظت آنزیم، دوبرابر می‌شود. از آنجایی‌که غلظت‌های سوبسترا یکسان هستند، غلظت‌های تعادلی نهایی محصول در تمامی موارد یکسان خواهد بود؛ هرچند، در این آزمایش‌ها که مقادیر کم آنزیم وجود دارند، تعادل با سرعت آهسته‌تری حاصل خواهد شد.



شکل ۴۸-۱۰ برآورد گرافیکی K_m از نمودار v_0 در برابر[S]. K_m غلظت سوبسترایی است که در آنزیم نصف سرعت حداکثر را دارد.

تولید محصول به صورت زیر است

$$v=\frac{k_3[\mathrm{E}][\mathrm{S}]}{(k_3+k_2)/k_1)+[\mathrm{S}]} \qquad (۱۰-۱۷)$$

با بیان مجموع ثابت‌های مخرج با اصطلاح K_m و اگر واکنش $\mathrm{ES} \rightarrow \mathrm{E+P}$ در معادله ۱۶-۱۰ مرحله محدودکننده-سرعت باشد، آنگاه k_3 فعالیت کاتالیتیک آنزیم (k_{cat}) را تعیین خواهد کرد و معادله به صورت زیر می‌شود

$$v=\frac{k_{cat}[\mathrm{E_t}][\mathrm{S}]}{(K_m+[\mathrm{S}])} \qquad (۱۰-۱۸)$$

به شباهت معادلات ۱۵-۱۰ و ۱۸-۱۰ توجه کنید. از آنجایی که k_{cat} (ثابت سرعت) و $[\mathrm{E_t}]$ (غلظت کل آنزیم) ثابت هستند، $k_{cat}[\mathrm{E_t}]$ برابر V_m می‌باشد. این معادله را می‌توان به صورت زیر نوشت

$$v=\frac{V_m[\mathrm{S}]}{(K_m+[\mathrm{S}])} \qquad (۱۰-۱۹)$$

که آن را **معادله میکائیلیس-منتن**[1] گویند. برای واکنش‌هایی که پیچیده‌تر هستند، k_{cat} شامل مجموعه‌ای از ثابت‌های سرعت است. V_m در معادله ۱۹-۱۰ **سرعت حداکثر** واکنش در یک غلظت آنزیمی خاص می‌باشد و واحد مول محصول در هر واحد زمان را دارد. لذا V_m (یعنی، $k_{cat}[\mathrm{E_t}]$ یا $k_3[E_t]$) برای یک غلظت آنزیمی خاص، ثابت می‌باشد. در صورتی که غلظت آنزیمی افزایش یا کاهش پیدا کند، V_m به ترتیب افزایش و کاهش پیدا خواهد نمود (شکل ۴۷-۱۰). K_m غلظتی از سوبستراست که در آن سرعت واکنش (v) به نصف سرعت حداکثر (V_m) می‌رسد، یعنی $v/V_m=۰/۵$ در هنگام $K_m=\mathrm{S}$ (شکل ۴۸-۱۰). وقتی v برابر نصف V_m است، نصف غلظت کل آنزیم به شکل کمپلکس با سوبسترا وجود دارد و نصف دیگر آزاد می‌باشد. تحت این شرایط، واکنش به V_m می‌رسد، زیرا سرعت $v=V_m$ خواهد بود. معمولاً گفته می‌شود که وقتی [S] نزدیک به $[K_m]$۲۰ است، به V_m نزدیک می‌شویم، زیرا در این شرایط v برابر $۲۰/۲۱ \times V_m$ یا $۰/۹۵V_m$ می‌باشد. این ماهیت دوفازی مکانیسم‌های آنزیمی، یعنی اتصال و به دنبال آن تغییر سوبسترا، در ارتباط بالینی ۳-۱۰ مورد تأکید قرار گرفته است.

وقتی واکنش پیچیده‌تر است، نظیر

$$\mathrm{E+S} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \xrightarrow{k_3} \mathrm{ES'} \xrightarrow{k_5} \mathrm{E+P} \qquad (۱۰-۲۰)$$

که در آن ES′ شکل تغییریافته ولی مستقل کمپلکس است، آنگاه معادله سرعت به صورت زیر می‌شود

1. Michaelis-Menten equation

ارتباط بالینی ۱۰-۲

موردی از نقرس دو فاز مکانیسم عمل آنزیمی را نشان می‌دهد

دو فاز مدل میکائیلیس-منتن فعالیت آنزیمی، اتصال و به‌دنبال آن تغییر سوبسترا، با مطالعاتی بر روی یک خانواده مبتلا به نقرس شرح داده می‌شود. میزان دفع ادراری اسید اوریک بیمار سه برابر میزان طبیعی بود و میزان ۵-فسفوریبوزیل-α-پیروفسفات (PRPP) در گلبول‌های قرمز وی افزایش قابل‌توجهی را داشت. PRPP یک ترکیب واسط در بیوسنتز AMP و GMP است که به ATP و GTP تبدیل می‌شوند. اسید اوریک حاصل تخریب AMP و GMP است. آزمون‌های داخل آزمایشگاه افزایش سه برابری فعالیت PRPP سنتاز گلبول‌های قرمز بیمار را نشان دادند. pH مطلوب و K_m این آنزیم برای ATP و ریبوز ۵-فسفات طبیعی بودند، ولی V_m افزایش سه برابر داشت! این افزایش ناشی از افزایش میزان آنزیم نبود؛ آزمایش ایمونولوژیکی با یک آنتی‌بادی اختصاصی ضد این آنزیم نشان داد که میزان آنزیم همانند میزان پروتئین آنزیم موجود در گلبول‌های قرمز طبیعی است. این یافته نشان داد که اتصال سوبسترا که با K_m منعکس می‌شود، و رخداد شیمیایی بعدی در کاتالیز که با V_{max} منعکس می‌گردد، فازهای مجزایی در کل فرایند کاتالیتیک هستند. این موضوع تنها برای مکانیسم‌های آنزیمی صادق است که در آنها $k_2 << k_3$ می‌باشد.

$$v = \frac{k_3k_5/(k_3+k_5)[E_t][S]}{k_5(k_2+k_3)/k_1(k_3+k_5)+[S]} \qquad (۱۰-۲۱)$$

با بررسی معادلات ۱۷-۱۰ و ۲۱-۱۰ مشخص می‌شود که شکل عمومی معادله به‌صورت زیر است

$$v = \frac{\text{Constant}[E_t][S]}{\text{Constant} + [S]} \qquad (۱۰-۲۲)$$

این همان معادله عمومی همانند معادله ۱۸-۱۰ می‌باشد. ثابت‌های[1] سرعت صورت جمع و به k_{cat} تبدیل می‌شوند، در حالی‌که مجموع ثابت‌های موجود در مخرج به‌صورت K_m تعریف می‌شوند. لذا هم k_{cat} و هم K_m معمولاً متشکل از مجموعه پیچیده‌ای از ثابت‌های سرعت مجزا هستند. ثابت‌های اختصاصی که این اصطلاحات را می‌سازند، با مکانیسم کینتیکی واقعی و بزرگی ثابت‌های سرعت مجزا ارتباط دارند. به عنوان مثال، اگر میزان k_3 در معادله ۲۱-۱۰ بسیار بزرگتر از k_5 باشد، آنگاه k_{cat} تقریباً برابر k_3 می‌شود، زیرا مجموع k_3 و k_5 اساساً میزان k_3 خواهد بود. هر چند اگر دو ثابت سرعت مقادیر مشابهی داشته باشند، آنگاه k_{cat} شامل ترکیبی از چندین پارامتر خواهد بود؛ همین حالت در مورد K_m وجود دارد که واحد آن غلظت است.

غلظت آنزیم آزاد

اقتباس معادله میکائیلیس-منتن نیاز به توجه دقیق به تمامی اشکال آنزیم دارد. فرض کنید که غلظت سوبسترا بیش از غلظت آنزیم است، طوری که اندازه‌گیری میزان [S] در ابتدای دوره واکنش تغییری را نشان نمی‌دهد. به‌طور آشکار می‌توان از مقادیر مختلف [S] استفاده

1. Constants

نمود، ولی برای هر کدام این میزان در طی واکنش ثابت خواهد ماند. برای واکنش ساده $E+S \rightleftarrows ES \rightarrow E+P$، غلظت آنزیم همیشه برابر مجموع آنزیم آزاد و آنزیم متصل به سوبسترا می‌باشد؛ یعنی

$$[E_t] = [E_f] + [ES] \qquad (۱۰-۲۳)$$

$[E_t]$ غلظت کل آنزیم است و $[E_f]$ غلظت آنزیم آزاد می‌باشد. برای واکنش نیاز به E_f می‌باشد تا با سوبسترا تعامل کند. غلظت آنزیم آزاد مستقیماً اندازه‌گیری نشده، بلکه غلظت آنزیم کل اندازه‌گیری می‌شود. یعنی

$$[E_t]-[ES]=[E_f] \qquad (۱۰-۲۴)$$

اگر اشکال دیگری از آنزیم، نظیر شکل متصل به مهارکننده (ص ۵۵۲)، وجود داشته باشند، آنگاه معادله ۲۴-۱۰ را می‌بایست طوری نوشت که تمامی این اشکال آنزیمی را شامل گردد.

مفهوم K_m

K_m متشکل از چندین ثابت سرعت است و یک ثابت تفکیک (K_d) اقتباس‌شده نیست. با این وجود، از میزان K_m اغلب برای نشان‌دادن میزان تمایل سوبسترا برای اتصال به یک آنزیم استفاده می‌شود. K_m برابر 10^{-7}M به این معنی است که در مقایسه با میزان K_m برابر 10^{-5}M، سوبسترا تمایل بیشتری برای آنزیم دارد. هر چه میزان K_m کوچکتر باشد، تعامل بین سوبسترا و آنزیم محکم‌تر خواهد بود. با این وجود اینکه K_m یک ثابت تفکیک نیست، میزان کوچکتر آن به معنی آن است که میزان کمتری سوبسترا برای اتصال به ۵۰٪ آنزیم مورد نیاز می‌باشد (ارتباط بالینی ۴-۱۰).

مصرف فیزیولوژیکی گلوکز، مثالی برای اشاره به اهمیت K_m می‌باشد. گلوکز می‌تواند توسط دو کیناز مختلف فسفریله شده و تولید گلوکز ۶- فسفات کند. کبد هر دو آنزیم هگزوکیناز و گلوکوکیناز را دارد که واکنش یکسان گلوکز + ATP ← گلوکز ۶-فسفات + ADP را کاتالیز می‌کنند. در مورد هگزوکیناز، K_m گلوکز برابر ۰٫۱mM است، در حالی که برای گلوکوکیناز این میزان 5mM می‌باشد. وقتی میزان گلوکز خون پایین است، مثلاً در هنگام ناشتایی، هگزوکیناز برای فسفریلاسیون گلوکز مورد استفاده قرار می‌گیرد، در حالی که در هنگام افزایش گلوکز خون بعد از خوردن غذا، آنزیم دارای K_m بالا نیز وارد عمل می‌شود.

عدد نوسازی (k_{cat})

در معادله ۱۸-۱۰، k_{cat} صورت واحد عکس زمان را دارد. این ثابت را **عدد نوسازی**[1] آنزیم

1. Turnover number

ارتباط بالینی ۴-۱۰

اثر فیزیولوژیک تغییر در مقادیر K_m آنزیمی

حساسیت غیرمعمول آسیایی‌ها به مشروبات الکلی، اساس بیوشیمیایی دارد. در برخی ژاپنی‌ها و چینی‌ها، در مقایسه با اروپایی‌ها، مقادیر بسیار کمتر اتانل سبب اتساع عروقی می‌شود که نتیجه آن برافروختگی صورت و افزایش ضربان قلب می‌باشد. این اثرات فیزیولوژیک ناشی از استالدئید تولیدی در واکنش الکل دهیدروژناز می‌باشد. استالدئید توسط آلدئید دهیدروژناز (ALDH) به استات تبدیل می‌شود. در برخی افراد مبتلا، یک اسید آمینه در موقعیت ۴۸۷ در زیرواحد ۵۰۰ اسید آمینه‌ای آنزیم تترامری تغییر یافته است. آنزیم فعال یک گلوتامات دارد، در حالی‌که آنزیم غیرفعال یک لیزین دارد. واریانت آسیایی فعالیت بسیار پایینی دارد و K_m آن برای NAD^+ از ۳۰µM تا ۷۰۰۰µM افزایش دارد. با وجود این که آنزیم فعال است، به‌دلیل میزان بسیار بالای K_m و پایین k_{cat}، فعالیت بسیار پایینی دارد.

به علاوه افراد مبتلا هتروزیگوت هستند، به‌طوری‌که ژن‌های مربوط به هر دو آنزیم گلوتاماتی فعال و آنزیم لیزینی اساساً غیرفعال را دارند. انتظار می‌رود که آنزیم آنها ۵۰٪ فعال باشد، در حالی‌که فعالیت آن بسیار پایین است. ALDH تولید تترامرهایی از دو منومر (E_4، E_3K، E_2K_2، EK_3 و K_4) می‌کند که در آنها E_4 و K_4 اشکالی از به‌ترتیب هُموتترامرهای مربوط به زیرواحدهای حاوی گلوتامات و لیزین می‌باشند و بقیه هتروتترامر هستند. E_3K میزان ۵۰٪، و نه ۷۵٪، فعالیت را دارد، در حالی‌که EK_3 اساساً فاقد فعالیت است و نه این که انتظار داشته باشیم به‌دلیل داشتن یک زیرواحد فعال دارای ۲۵٪ فعالیت باشد. زیرواحد K از نظر توانایی در غیرفعال‌سازی زیرواحدی که با آن جفت می‌شود، غالب می‌باشد زیرا ریشه موجود در موقعیت ۴۸۷ با یک آرژینین در موقعیت ۴۷۵ تعامل می‌کند. وقتی یک گلوتامات در موقعیت ۴۸۷ قرار دارد، امکان حرکت آرژینین را فراهم می‌سازد. این حرکت سبب از بین رفتن پاکت اتصال به NAD می‌شود، گر چه ریشه ۴۸۷ در تماس با فولد راسمن نیست. این مثال این واقعیت را نشان می‌دهد که یک جهش نقطه‌ای بر روی آنزیم می‌تواند حتی اگر این ریشه در تماس با جایگاه فعال نباشد، بر روی این ناحیه تأثیر داشته باشد. این مثال همچنین نشان می‌دهد که یک زیرواحد می‌تواند بر دیگری غالب باشد.

نیز می‌گویند که تعداد ملکول‌های سوبسترای تبدیلی به محصول در هر واحد زمان به ازاء هر ملکول آنزیم می‌باشد. هر چه میزان k_{cat} برای یک آنزیم بیشتر باشد، واکنش سریع‌تر انجام خواهد شد. در مجموع، این اصطلاح اشاره به آهسته‌ترین مرحله (مراحل) در کل واکنش دارد.

اهمیت k_{cat} در معادله میکائیلیس- مِنتِن

وقتی غلظت سوبسترا بسیار بیشتر از K_m است

معادله ۱۸-۱۰ به شکل یک معادله هیپربولیک عمومی است. وقتی میزان [S] بسیار بیشتر از میزان K_m است، میزان مخرج اساساً برابر [S] می‌باشد و معادله را می‌توان به صورت زیر برآورد نمود

$$v=\frac{k_{cat}[E][S]}{[S]}=k_{cat}[E] \qquad (۱۰-۲۵)$$

به‌عبارت دیگر، سرعت مستقل از غلظت سوبسترا می‌شود؛ واکنش نسبت به S درجه صفر می‌شود. این حالت در قسمتی از منحنی مشاهده می‌گردد که در آن دیگر با افزایش غلظت [S] اساساً دیگر سرعت افزایش پیدا نمی‌کند (شیب برابر صفر) (شکل ۴۶-۱۰ را ببینید). تحت این شرایط واکنش با حداکثر سرعت پیشرفت می‌کند، زیرا اساساً ۱۰۰٪

آنزیم به شکل کمپلکس ES می‌باشد. در لحظه‌ای که یک محصول تولید می‌شود، از آنزیم جدا شده و ملکول دیگر S به آنزیم اتصال می‌یابد تا همواره آنزیم اشباع از سوبسترا باقی بماند. تحت این شرایط سرعت تنها تحت تأثیر عواملی از واکنش قرار می‌گیرد که ES را به محصول تبدیل می‌کنند ($ES \rightarrow S + P$).

وقتی غلظت سوبسترا بسیار کمتر از K_m است

وقتی [S] در مقایسه با K_m بسیار کوچک است، معادله ۱۷-۱۰ را می‌توان به صورت زیر برآورد نمود

$$v = \frac{k_{cat}[E_t][S]}{K_m} = \quad \text{یا} \quad v = \frac{V_{max}[S]}{K_m} \qquad (10\text{-}26)$$

نمودار v در برابر [S] تا زمانی خطی است که $[S] << K_m$ میزان باشد. از آنجایی‌که برای هر واکنش شیمیایی سرعت تولید محصول برابر حاصلضرب ثابت سرعت در غلظت واکنشگرها می‌باشد، اصطلاح k_{cat}/K_m را می‌توان به‌عنوان یک ثابت سرعت درجه-دوم در نظر گرفت، زیرا دو واژه غلظت ($[E_t]$ و [S]) در معادله سرعت وجود دارد. این واقعیت که این نسبت معادل ثابت سرعت درجه-دوم است، فشارهای خاصی را بر نسبت وارد می‌کند. برای مثال، یک ثابت سرعت نمی‌تواند سریع‌تر از سرعت انتشار دو ملکول در محلول باشد. حتی اگر انرژی فعال‌سازی مورد نیاز نباشد، دو ملکول می‌بایست با یکدیگر تصادم نموده تا یک واکنش رخ دهد. ثابت سرعت یک واکنش انتشاری درجه-دوم حدود 10^9/mole/sec می‌باشد. لذا اگر k_{cat} بسیار بزرگ باشد، K_m نمی‌تواند بسیار کوچک باشد در غیر این صورت نسبت از سرعت انتشار فراتر می‌رود. به‌عنوان مثال، کاتالاز که در تجزیه پراکسید هیدروژن به اکسیژن و آب نقش دارد، دارای k_{cat} برابر 4×10^7/sec می‌باشد. هر چند K_m پراکسید هیدروژن برابر 1 M می‌باشد که بسیار بالا است. نسبت k_{cat}/K_m به اندازه ۲۵ برابر (10^9 در برابر 4×10^7) کمتر از سرعت حداکثر تئوری است که امکان رسیدن به واکنش‌های درجه-دوم وجود دارد. کاتالاز یکی از سریع‌ترین آنزیم‌های شناخته‌شده در هنگام اندازه‌گیری k_{cat}/K_m می‌باشد.

k_{cat} تنها زمانی می‌تواند یک عدد بسیار کوچک (نظیر ۱ تا ۱۰ در ثانیه) باشد که K_m سوبسترا بسیار کم (برای مثال، 1×10^{-9}M) باشد. این سرعت آهسته به معنی این است که یک ملکول آنزیم تنها ۱ تا ۱۰ ملکول محصول را در هر ثانیه تولید خواهد کرد. این واکنش به این دلیل اینقدر آهسته است که سوبسترا به‌طور محکم به آنزیم اتصال می‌یابد. برای تبدیل سوبسترای اتصال‌یافته به حالت انتقالی نیاز به انرژی زیادی است. برای یک K_m فوق‌العاده کوچک (تمایل بالا) برای سوبسترا لازم است واکنش شیمیایی آهسته باشد، در حالی که K_m بزرگ (تمایل پایین) به معنی این است که k_{cat} می‌تواند زیاد باشد. مقادیر k_{cat}/K_m آنزیم‌ها در دامنه ۱۰ تا 10^7 در ثانیه می‌باشد.

واکنش‌های قابل برگشت

محدودیت دیگر نسبت k_{cat}/K_m زمانی مشاهده می‌گردد که واکنش برگشت‌پذیر باشد.

$$E + S \underset{k_r}{\overset{k_f}{\rightleftharpoons}} E + P \qquad (۱۰-۲۷)$$

k_f و k_r ثابت‌های سرعت رفت و برگشت هستند (از ES و EP صرفنظر شده است، زیرا در هر دو جهت یکسان هستند). می‌توان دریافت که k_f برابر $(k_{cat}/K_m)_f$ و k_r برابر $(k_{cat}/K_m)_r$ می‌باشد. برای یک واکنش برگشت‌پذیر، ثابت تعادل $K_{eq} = ([P]/[S])$ برابر است با k_f/k_r یا

$$K_{eq} = \frac{(k_{cat}/K_m)_f}{(k_{cat}/K_m)_r} \qquad (۱۰-۲۸)$$

مقادیر k_{cat} و K_m نمی‌توانند به‌طور تصادفی تغییر کنند، زیرا نسبت آنها برابر K_{eq} است. این به‌معنی آن است که اگر یک آنزیم جهش‌یافته میزان k_{cat} بیش از آنزیم ابتدایی داشته باشد، ثابت دیگری می‌بایست تغییر یابد تا وضعیت تعادل را برقرار کند. این نوع ارتباطات نوع-تعادلی را ارتباطات **هالدان**[1] گویند.

K_m پایین در برابر k_{cat} بالا

از آنجایی که نسبت k_{cat}/K_m یک حد بالا دارد، سؤالی که مطرح می‌شود این است که آیا بهتر نیست یک آنزیم میزان بسیار پایین K_m یا بسیار بالای k_{cat} را داشته باشد. اغلب تصور می‌شود که میزان K_m پایین بهتر است و ترکیباتی که کمترین K_m را دارند، به‌عنوان بهترین سوبستراها گزارش شده‌اند. در واقع، ترکیبی با بیشترین نسبت k_{cat}/K_m، بهترین سوبسترا است. در k_{cat}/K_m ثابت، بهتر است یک k_{cat} بالا، تا یک K_m پایین، داشته باشیم. مثالی در جدول ۴-۱۰ آورده شده است. در یک غلظت ثابت سوبسترا، ۱ mM در این مثال، سرعت کل همیشه سریع‌تر است، وقتی K_m بالا است سبب می‌شود تا برای برقراری نسبت k_{cat}/K_m میزان k_{cat} شود. بنابراین، در هنگام ارزیابی سوبستراهای مختلف برای یک آنزیم، سوبستراهای دارای بیشترین مقادیر k_{cat}/K_m، و نه سوبسترای دارای کمترین K_m، می‌بایست به‌عنوان سوبستراهای بهتری برای آن آنزیم در نظر گرفته شوند.

در یک سلول تنها k_{cat} و K_m نیستند که اهمیت دارند، بلکه باید به غلظت کل آنزیم نیز توجه نمود. اصطلاح سرعت در ارتباط با آنزیم از نوع درجه اول است، لذا چند پیکومول آنزیم دارای k_{cat}/K_m برابر $۱۰^{۷}$/sec/M در سلول، نسبت به یک نانومول از آنزیمی با k_{cat}/K_m برابر $۱۰^{۵}$/sec/M، کارایی کمتری در تبدیل یک سوبسترا به محصول دارد.

جدول ۴-۱۰ • ارتباطات K_m و k_{cat} [1]

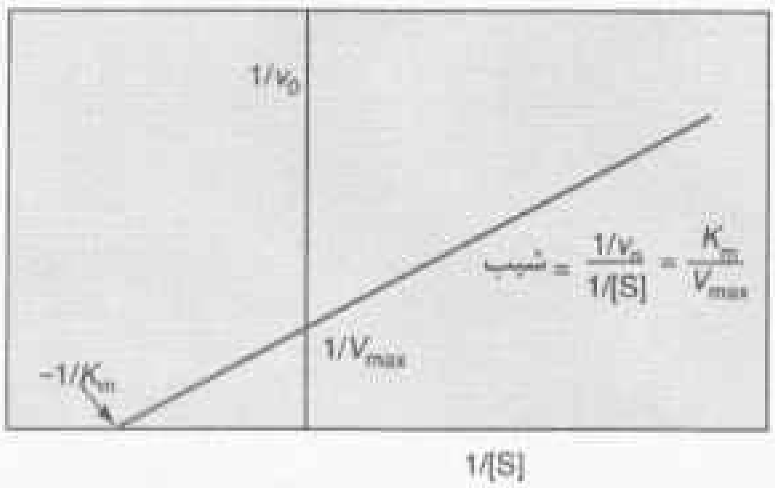
K_m (M)	k_{cat} (s^{-1})	Rate (s^{-1})
$۱۰^{-۶}$	۱	۱
$۱۰^{-۵}$	۱۰	۹
$۱۰^{-۴}$	$۱۰^{۲}$	۹۰
$۱۰^{-۳}$	$۱۰^{۳}$	۵۰۰
$۱۰^{-۲}$	$۱۰^{۴}$	۹۰۹
$۱۰^{-۱}$	$۱۰^{۵}$	۹۹۰
۱	$۱۰^{۶}$	۹۹۹

[1] شرایط واکنش: $k_{cat}/K_m = ۱۰^{۶} M^{-1}s^{-1}$ و $[S] = ۱۰^{-۳} M$

محاسبه ثابت‌ها

K_m را می‌توان از نمودارهای v در برابر [S] برآورد نمود. نمایش‌های گرافیکی امکان محاسبه

1. Haldane relationships



شکل ۴۹-۱۰ تعیین K_m و V_{max} از نمودار معکوس-دوطرفه لینویور- برک. با استفاده از نمودارهای عکس سرعت ابتدایی در برابر عکس غلظت سوبسترا برای تعیین سرعت ابتدایی، خطی حاصل می‌شود که محل تقاطع آن با x برابر $-1/K_m$ است. زیرا در $1/v_0 = 0$ میزان $1/[S]$ در معادله ۲۹-۱۰ برابر 1/Km می‌باشد.

ثابت‌های کینتیکی را فراهم می‌سازند. معمول‌ترین نمایش گرافیکی براساس **معادله لینویور-برک**[1] می‌باشد که معکوس دوطرفه معادله میکائیلیس-منتن است. معکوس معادله ۱۹-۱۰ به صورت زیر است

$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V_m}+\frac{K_m}{V_m}\times\frac{1}{[S]} \qquad (۱۰-۲۹)$$

نمودار $1/v_0$ در مقابل $1/[S]$ یک خط مستقیم است (شکل ۴۹-۱۰)؛ محل تقاطع با محور y معادل $1/V_m$ و محل تقاطع با محور x معادل $-1/K_m$ می‌باشد؛ شیب خط برابر K_m/V_m می‌باشد. از اینرو با استفاده از نمودار $1/v_0$ در غلظت‌های مختلف $1/[S]$، دو پارامتر کلیدی واکنش آنزیمی را می‌توان تعیین نمود. به‌طریق دیگر، برنامه‌های کامپیوتری قادر به محاسبه k_{cat} و K_m از داده‌های سرعت و سوبسترا می‌باشند.

سوبسترا و محصول به یک جایگاه اتصال می‌یابند

وجود محصول به عنوان یک مهارکننده واکنش عمل می‌کند، زیرا وجود آن می‌تواند مانع اتصال سوبسترا شود. محصول می‌تواند یک مهارکننده رقابتی باشد، زیرا هم S و هم P به E_f اتصال می‌یابد. معادله‌ای که سرعت ابتدایی واکنش را به وجود محصول مرتبط می‌کند، به صورت زیر می‌باشد

$$v=\frac{V_m[S]}{K_m(1+[P]/K_{mp})+[S]} \qquad (۱۰-۳۰)$$

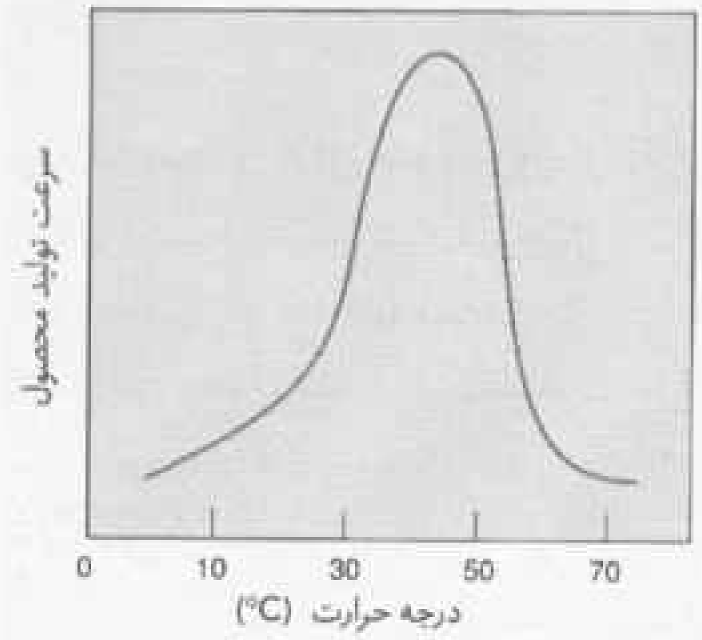
که در آن K_{mp} اشاره به K_m برای محصول، با فرض قابلیت برگشت واکنش، دارد. در ابتدای انجام یک آزمایش در آزمایشگاه، محصولات وجود ندارند، ولی با گذشت زمان شروع به تجمع می‌کنند. نمودار مربوط به تولید محصول به عنوان تابعی از زمان، در ابتدا خطی خواهد بود، ولی با گذشت زمان که محصول تجمع می‌یابد و به عنوان یک مهارکننده عمل می‌کند، شیب آن کاهش می‌یابد (شکل ۴۴-۱۰ را ببینید).

اثر شرایط آزمایش

وقتی یک واکنش تحت شرایط V_m انجام می‌شود، اساساً ۱۰۰٪ آنزیم به شکل کمپلکس ES می‌باشد. برعکس، وقتی یک واکنش زمانی مورد مطالعه قرار می‌گیرد که $[S]<<K_m$ است، اثری که مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد، انعکاسی از چیزی خواهد بود که با هر دو آنزیم آزاد و متصل به سوبسترا رخ می‌دهد. لذا مطالعه اثر یک تغییر محیطی نظیر pH تحت شرایط V_{max} اطلاعاتی را در خصوص k_{cat} برای تمامی آنزیم متصل به سوبسترا فراهم می‌کند. برای محاسبه اثر pH بر روی آنزیم آزاد، آنگاه لازم است k_{cat}/K_m به عنوان تابعی از pH تعیین شود.

1. Lineweaver-Burk equation

شرایط محیطی نظیر pH، درجه حرارت و غلظت نمک، بر روی فعالیت آنزیم اثر می‌گذارد. در هنگام انجام آزمایش‌های آنزیمی در آزمایشگاه، این اثرات بسیار مهم هستند.



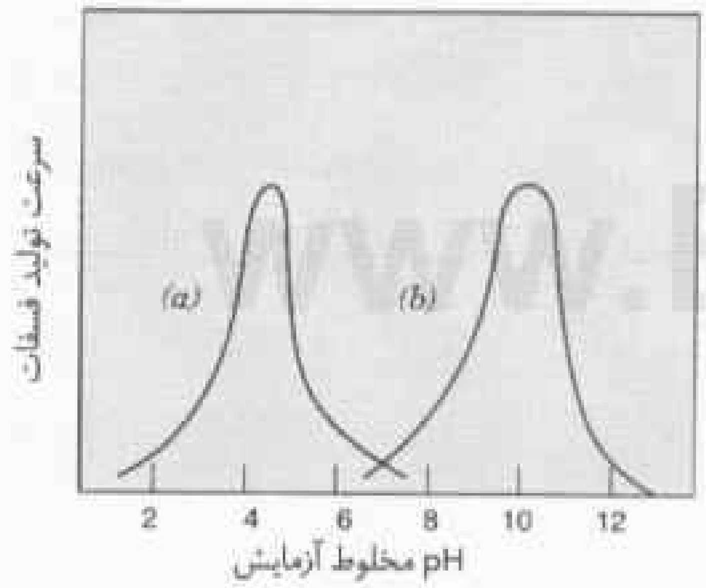
شکل ۵۰-۱۰ وابستگی حرارتی یک آنزیم شاخص پستانداران. در سمت چپ حالت مطلوب، سرعت به این دلیل پایین است که درجه حرارت محیط آنقدر پایین است که نمی‌تواند انرژی جنبشی مورد نیاز برای غلبه بر انرژی فعال‌سازی را فراهم کند. در سمت راست حالت مطلوب، آنزیم به‌دلیل دناتوراسیون حرارتی غیرفعال می‌باشد.

درجه حرارت

نمودار سرعت در برابر درجه حرارت اکثر آنزیم‌های پستانداران یک منحنی زنگوله - شکل با درجه حرارت مطلوب بین ۴۰°C تا ۴۵°C می‌باشد. (شکل ۵۰-۱۰) در بالای این درجه حرارت، دناتوراسیون حرارتی آنزیم رخ می‌دهد؛ برخی آنزیم‌ها در درجه حرارت‌های پایین‌تر دناتوره می‌شوند. معمولاً افزایش درجه حرارت از ۰°C تا ۴۰°C همراه با افزایش دو برابر فعالیت آنزیمی به ازاء هر ۱۰°C افزایش درجه حرارت می‌باشد. جهش یک آنزیم به یک شکل حساس به حرارت می‌تواند عوارض جدی را به دنبال داشته باشد (ارتباط بالینی ۵-۱۰).

pH

تقریباً تمامی آنزیم‌ها یک پروفایل pH-سرعت زنگوله-شکل را نشان می‌دهند، ولی حداکثر (**pH مطلوب**) به میزان زیادی در مورد آنزیم‌های مختلف، متفاوت می‌باشد. هر دو شکل فسفاتازهای اسیدی و قلیایی در انسان وجود دارند که pH مطلوب آنها بسیار متفاوت است (شکل ۵۱-۱۰). منحنی زنگوله-شکل و موقعیت آن بر روی محور x وابسته به حالت یونیزه خاص سوبسترا می‌باشد که به‌طور مطلوب به آنزیم اتصال می‌یابد. این به نوبه خود وابسته به یونیزاسیون ریشه‌های اسید آمینه‌ای اختصاصی می‌باشد که جایگاه اتصال به سوبسترا را تشکیل می‌دهند. به علاوه، ریشه‌های اسید آمینه درگیر در کاتالیز واکنش می‌بایست برای فعالیت در وضعیت باری صحیح قرار داشته باشند. ارتباط بالینی ۶-۱۰، اثر یک جهش در تغییر pH مطلوب یک آنزیم دارای اهمیت فیزیولوژیکی را شرح می‌دهد.



شکل ۵۱-۱۰ وابستگی واکنش‌های فسفاتاز (a) اسیدی و (b) قلیایی به pH. در هر کدام از این موارد، مطلوب اشاره به وضعیت یونی ایده‌آل برای اتصال آنزیم و سوبسترا به یکدیگر و وضعیت یونی مناسب زنجیرهای جانبی اسیدهای آمینه درگیر در رویداد کاتالیتیک دارد.

ارتباط بالینی ۵-۱۰

ناپایداری حرارتی گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز منجر به کم‌خونی همولیتیک می‌شود

گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) یک آنزیم مهم برای حفظ سلامت غشایی گلبول‌های قرمز خون است. کمبود یا عدم فعالیت این آنزیم منجر به یک کم‌خونی همولیتیک می‌شود. در موارد دیگر، یک آنزیم واریانت وجود دارد که به‌طورطبیعی فعالیت کافی برای حفظ غشاء دارد، ولی در شرایط استرس اکسیداتیو نارسا می‌باشد. جهشی در این آنزیم منجر به تولید پروتئینی می‌شود که ثابت‌های کینتیکی طبیعی، ولی یک ناپایداری حرارتی دارد. این حالت به‌خصوص در گلبول‌های قرمز مهم می‌باشد که فاقد ظرفیت سنتز پروتئین است و نمی‌تواند آنزیم‌هایی که دناتوره شده‌اند را دوباره بسازد. نتیجه نهایی کاهش شدید عمر گلبول‌های قرمز خون است که G6PD ناپایدار دارند. این گلبول‌ها نسبت به همولیز ناشی از دارو نیز حساس هستند.

ارتباط بالینی ۶-۱۰

ایزوآنزیم‌های الکل دهیدروژناز دارای pH مطلوب متفاوت

علاوه‌بر ترکیب ایزوآنزیم آلدئید دهیدروژناز در برخی آسیایی‌ها، ایزوآنزیم‌های الکل دهیدروژناز (ADH) متفاوتی نیز وجود دارند. ADH توسط سه ژن کد می‌شود که تولید سه پلی‌پپتید متفاوت α، β، و γ می‌کنند. در ژن β سه آلل وجود دارد که اختلاف آنها در یک باز نوکلئوتیدی است؛ نتیجه جایگزینی آرژنین می‌باشد. این جایگزینی‌ها به شرح زیر است.

	ریشه ۴۷	ریشه ۳۶۹
β_1	Arg	Arg
β_2	His	Arg
β_3	Arg	Cys

شکل β_3 کبدی فعالیت ADH با pH مطلوب در نزدیکی ۷، در مقایسه با ۱۰ برای β_1، دارد. مرحله تعیین‌کننده-سرعت در الکل دهیدروژناز آزادسازی NADH است. NADH توسط پیوندهای یونی بین فسفات‌های کوآنزیم و آرژنین‌های موجود در موقعیت‌های ۴۷ و ۳۶۹ نگه داشته می‌شود. در ایزوزیم β_1 این تعامل یونی تا زمانی‌که pH کاملاً قلیایی نشده است و گروه گوانیدینوم آرژنین شروع به تفکیک H^+ نکرده است، شکسته نمی‌شود. جایگزینی اسیدهای آمینه دارای مقادیر pK پایین‌تر، همانند حالت موجود در β_2 و β_3، سبب تضعیف این تعامل شده و pH مطلوب را پایین می‌آورد. از آنجایی که آزادسازی NADH تسهیل می‌شود، مقادیر V_{max} برای β_2 و β_3 نیز بیش از میزان مربوط به β_1 است.

۱۰-۸ • کینتیک واکنش‌های دو-سوبسترایی

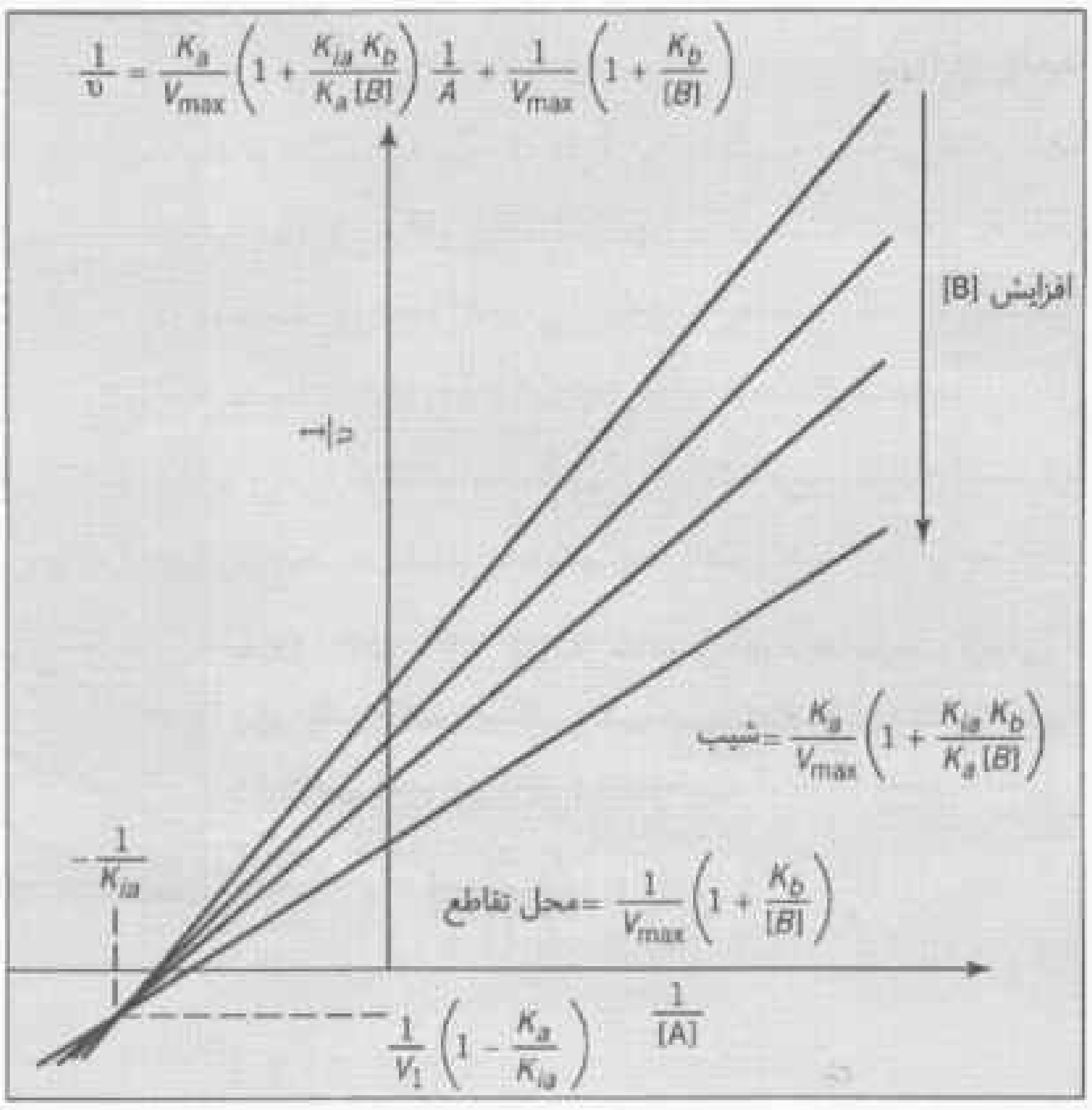
مکانیسم متوالی

دو مکانیسم تعاملات برای یک واکنش دو-سوبسترایی در شکل ۵۲-۱۰ شرح داده شده است. در **مکانیسم متوالی**[1] هر دو سوبسترا به طریق متوالی به آنزیم اتصال یافته تا تولید یک کمپلکس سه‌تایی کنند. با سوبستراهای A و B، این کمپلکس سه‌تایی E-A-B است (A، B، C،... سوبسترا، و P، Q، R، ... محصول هستند). در صورتی‌که A قبل از B متصل شود، آن را یک **واکنش متوالی-منظم** گویند، در حالی‌که اگر ابتدا A یا B متصل شود، آن را **واکنش متوالی-تصادفی** می‌نامند. معادله واکنش متوالی حاوی پارامترهای K_m مربوط به سوبستراهای A و B (K_a و K_b) و یک K_{ia} به‌عنوان ثابت تفکیک برای سوبسترای A می‌باشد. برای یافتن ثابت‌های مختلف، یک نمودار معکوس دوطرفه $1/v$ در مقابل $1/[A]$ برای واکنشی با غلظت‌های ثابت متفاوت سوبسترای B (شکل ۵۳-۱۰) رسم می‌شود. نمودار حاصل مجموعه‌ای از خطوط را نشان می‌دهد که با یکدیگر تقاطع دارند. ثابت‌های مجزا را می‌توان با ترسیم شیب‌ها و محل‌های تقاطع به‌عنوان تابع [B] به‌دست آورد.

مکانیسم پینگ-پنگی

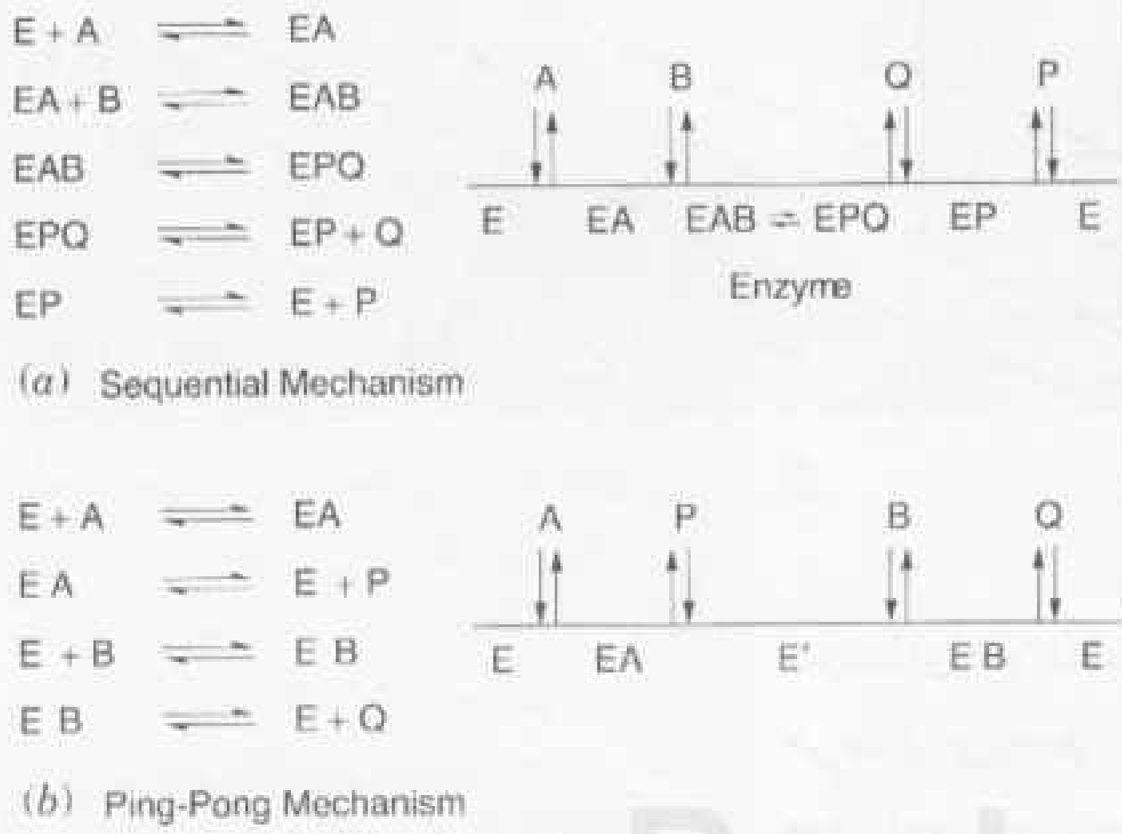
مکانیسم دوم یک واکنش دو-سوبسترایی را **مکانیسم پینگ-پنگی** گویند. سوبسترای A به آنزیم اتصال یافته، به محصول P تبدیل شده و آنزیم تغییریافته را ترک می‌کند. این آنزیم تغییریافته به سوبسترای B اتصال یافته و آن را به محصول Q تبدیل می‌کند. آنزیم‌هایی

1. Sequential



شکل ۵۳-۱۰ نمودار معکوس-دوطرفه سرعت ابتدایی برای یک واکنش متوالی. سوبسترای B در غلظت‌های مشخصی ثابت می‌باشد و سوبسترای A متغیر است. معادله واکنش به‌صورت زیر می‌باشد.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_{ia}K_b}{K_aB}\right)\frac{1}{A} + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_b}{B}\right)$$



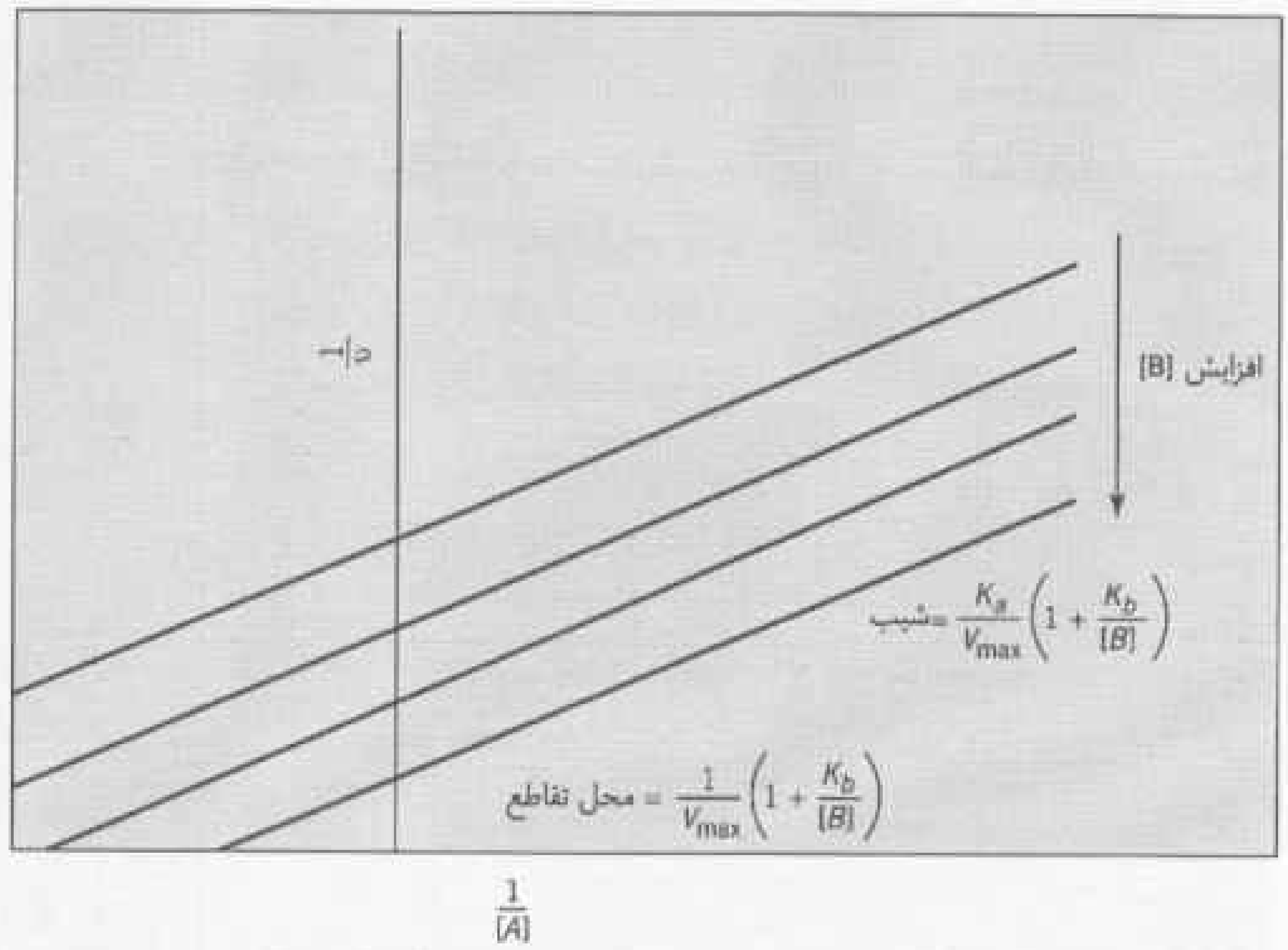
شکل ۵۲-۱۰ مکانیسم تعامل واکنش‌های دو سوبسترایی. (a) مکانیسم متوالی (b) مکانیسم پینگ-پنگی.

که کینتیک پینگ‌نگی را نشان می‌دهند، توسط سوبسترا تغییر داده می‌شوند. در کینازهایی که از یک مکانیسم پینگ-پنگی استفاده می‌کنند، ابتدا ATP یا نوکلئوزید تری‌فسفات دیگری به آنزیم اتصال یافته و سپس آنزیم را فسفریله می‌کند. ADP جدا شده و در ادامه سوبسترای دوم به این آنزیم فسفریله اتصال یافته و فسفات به آن منتقل می‌شود تا گیرنده فسفریله تولید گردد. بسیاری از آنزیم‌هایی که از کوآنزیم‌هایی بهره می‌برند که جدا نمی‌شوند، از واکنش‌های پینگ-پنگی استفاده می‌کنند.

معادله‌ای که در مکانیسم پینگ-پنگی بین سرعت و غلظت A و B ارتباط برقرار می‌کند، مشابه معادله واکنش متوالی است، ولی مهمترین تفاوت این است که فاقد K_{ia} موجود در معادله متوالی است. نمودارهای معکوس دوطرفه برای این واکنش منجر به ایجاد مجموعه‌ای از خطوط موازی می‌شود (شکل ۵۴-۱۰). دوباره، مقادیر مجزای K_m و V_m را می‌توان بعد از رسم نمودارهای مقادیر حاصل از هر غلظت B، از شیب‌ها و محل‌های تقاطع به‌دست آورد.

K_{mapp}

اغلب K_m برای تنها یکی از سوبستراها مورد نظر است. انجام در غلظت‌های بسیار بالای



شکل ۵۴-۱۰ نمودار معکوس-دوطرفه سرعت ابتدایی برای یک واکنش پینگ-پنگی. سوبسترای B در غلظت‌های مشخصی ثابت می‌باشد و سوبسترای A متغیر است. معادله واکنش به صورت زیر می‌باشد.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_b}{B}\right) + \frac{1}{V_{max}}\left(1 + \frac{K_b}{B}\right)$$

سوبسترای A و غلظت‌های متفاوت B، امکان تعیین K_{mapp} برای سوبسترای B را فراهم می‌سازد. این عملی است، زیرا وقتی K_a>>[A] است، معادله سرعت به یک معادله میکائیلیس-مِنتِن ساده تبدیل می‌شود.

۹-۱۰ • مهارکننده‌ها

بسیاری از شناخت پایه ما از مسیرهای متابولیکی با استفاده از مهارکننده‌های مربوط به آنزیم‌های اختصاصی حاصل شده است. هم‌اکنون ترکیبات دارویی به عنوان مهارکننده آنزیم‌های اختصاصی طراحی می‌شوند، و ترکیبات طبیعی متعدد به عنوان مهارکننده عمل می‌کنند (ارتباط بالینی ۷-۱۰). ترکیبات مهارکننده می‌توانند به آنزیم آزاد یا کمپلکس ES اتصال یافته و بر روی سرعت واکنش اثر بگذارند. در حضور یک مهارکننده (I)، هم EI و هم ESI می‌توانند وجود داشته باشند. معادله‌ای که غلظت کل آنزیم را با تمامی کمپلکس‌های احتمالی آن مرتبط می‌سازد، منجر به معادله میکائیلیس-مِنتِن جدیدی می‌شود که حاوی $1+[I]/K_i$ است که در آن K_i ثابت تفکیک EI یا ESI است. k_{cat} ظاهری[1] k_{cat} (k_{catapp}) در حضور یک مهارکننده است و K_m یک K_m ظاهری (K_{mapp}) خواهد بود؛ یعنی، میزانی اندازه‌گیری می‌شود که متفاوت از میزانی خواهد بود که در غیاب مهارکننده وجود خواهد داشت. غلظت مهارکننده طی دوره واکنش تغییر نمی‌کند، لذا [I] ثابت است. براساس این کینتیک واکنش‌ها، کلاس‌های مختلف مهارکننده‌ها تعریف شده‌اند.

1. Apparent

مهار رقابتی[1]

مهار رقابتی زمانی مشاهده می‌گردد که یک مهارکننده با سوبسترا برای اتصال به آنزیم آزاد با یکدیگر رقابت کنند. برخی **مهارکننده‌های رقابتی** از نظر ساختمانی شبیه سوبسترا یا محصول هستند، در حالی که بقیه ساختمان کاملاً متفاوتی دارند. برای مثال، مالونات که مهارکننده رقابتی سوکسینات دهیدروژناز است (شکل ۵۵-۱۰ و ص. ۷۵۱) احتمالاً به جایگاه اتصالی سوبسترا متصل می‌شود. پیرازول یک مهارکننده رقابتی الکل دهیدروژناز است، ولی از نظر ساختمان کاملاً متفاوت از سوبسترا می‌باشد. در صورتی که یک مهارکننده به جایگاه فعال یا جایگاه دیگری اتصال یابد و مانع اتصال S شود، واکنش همانند واکنش شکل ۵۶-۱۰ خواهد بود. مهارکننده با سوبسترا برای اتصال به آنزیم رقابت خواهد کرد، لذا وقتی مقدار زیادی سوبسترا وجود دارد، بر اثر مهارکننده غلبه خواهد کرد. میزان آنزیم موجود در کمپلکس ES تابعی از [S]، [I]، K_m، و $K_i\,(k_5/k_6)$ خواهد بود. از آنجایی‌که E_t برابر مجموع E_f، ES و EI است، معادله ۳۱-۱۰ حاصل می‌شود

$$v=\frac{k_3k_1[E_t][S]}{(k_2+k_3)(1+[I]/K_i)+k_1[S]} \qquad (10\text{-}31)$$

با تقسیم تمامی عبارات به k_1، معادله ۳۲-۱۰ حاصل می‌شود، زیرا $(k_2+k_3)/k_1$ در غیاب I برابر K_m است.

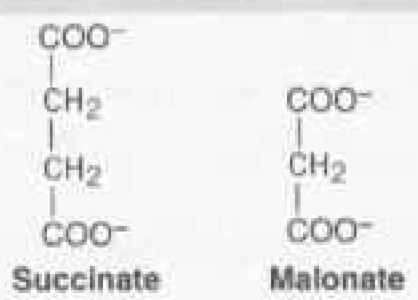
$$v=\frac{k_3[E][S]}{K_m(1+[I]/[K_i])+[S]} \qquad (10\text{-}32)$$

به شباهت بین معادلات ۳۲-۱۰ و ۱۶-۱۰ توجه کنید. چندین ثابت در مخرج وجود دارند که به شکل K_{mapp} جمع می‌شوند، زیرا [I] ثابت است، عبارت $1+[I]/K_i$ نیز یک ثابت می‌باشد. K_m اندازه‌گیری‌شده در حضور مهارکننده K_{mapp} خواهد بود، ولی این برابر حاصلضرب K_m واقعی در $(1+[I]/K_i)$ می‌باشد. در حضور یک مهارکننده، واکنش در غلظت سوبسترایی پایین‌تر آهسته‌تر خواهد بود، زیرا ثابت‌های موجود در مخرج بزرگتر از حالتی است که مهارکننده وجود ندارد. تنها وقتی [S] بسیار بیشتر از K_{mapp} است که طی آن مخرج تقریباً برابر تنها [S] خواهد بود، V_{max} حاصل خواهد شد. تحت این شرایط، واقعاً هیچ مهارکننده‌ای به آنزیم اتصال نمی‌یابد (ارتباط بالینی ۸-۱۰). هم سوبسترا و هم مهارکننده برای اتصال با یکدیگر رقابت می‌کنند، لذا افزایش غلظت سوبسترا بر اثر مهارکننده غلبه خواهد کرد. از نظر درمانی، مهارکننده‌های رقابتی تنها زمانی مفید هستند که میزان $[I]/K_i$ بالا است به‌طوری که مهارکننده می‌تواند در حضور حتی غلظت‌های بالای سوبسترا فعالیت کند. مقادیر پایین برای K_i (اتصال محکم) مورد نظر است، طوری که نیاز به مقادیر زیاد مهارکننده برای مهار آنزیم نمی‌باشد.

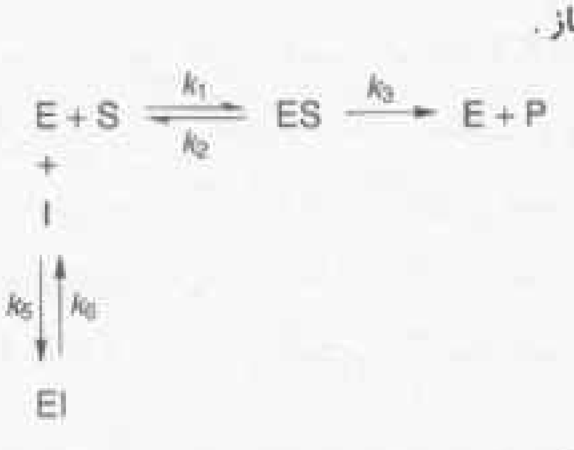
ارتباط بالینی ۷-۱۰

مهارکننده‌های گزانتین اکسیداز جداشده از گیاهان

نقرس بیماری التهابی است که به دلیل تولید بیش از حد یا کاهش دفع اسید اوریک، محصول انتهایی کاتابولیسم پورین‌ها (ص. ۱۰۸۹) حاصل می‌شود. مرحله انتهایی در متابولیسم پورین‌ها توسط گزانتین اکسیداز کاتالیز می‌شود. درمان معمول نقرس استفاده از آلوپورینول می‌باشد که آنالوگ ساختمانی گزانتین و مهارکننده این آنزیم است. بسیاری از جوامع قدیمی از گیاهان دارویی استفاده می‌کردند و آنهایی را که مؤثر می‌باشند را ثبت کرده‌اند. نوشتجات طب سنتی ویتنام نشان می‌دهد که ۹۶ گیاه، شامل *Chrysanthemum sinense*، در درمان نقرس مورد استفاده قرار گرفته است. نشان داده شده است تعدادی از عصاره‌های این گیاهان آنزیم گزانتین اکسیداز پستانداران را مهار می‌کنند و برخی به اندازه آلوپورینول مؤثر هستند. ساختمان اینها کاملاً متفاوت از ساختمان آلوپورینول و گزانتین می‌باشد. نتایج نشان می‌دهند که مطالعه ترکیباتی از طب سنتی ممکن است منجر به کشف ترکیبات دارویی جدید شود.



شکل ۵۵-۱۰ سوبسترا و مهارکننده سوکسینات دهیدروژناز.



شکل ۵۶-۱۰ واکنش یک مهارکننده رقابتی با آنزیم آزاد.

1. Competitive inhibition

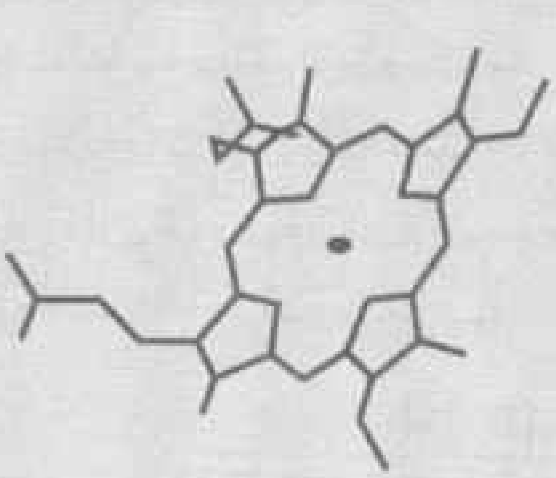
ارتباط بالینی ۸-۱۰

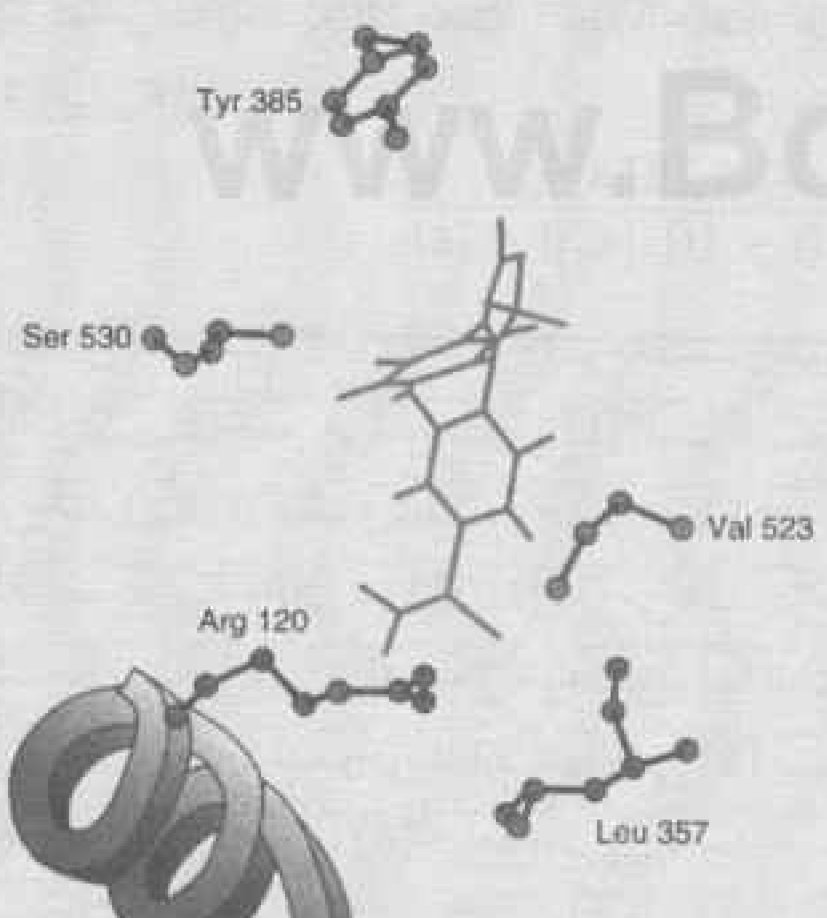
طراحی یک مهارکننده انتخابی

پروستاگلاندین‌ها کلاس بسیار مهمی از هورمون‌های پاراکرین هستند که از اسیدهای چرب زنجیر-بلند غیراشباع تولید می‌شوند (ص. ۹۹۴). یکی از مراحل ابتدایی سنتز این هورمون‌ها نیاز به آنزیم سیکلواکسیژناز (COX) دارد. بسیاری از اثرات فیزیولوژیکی پروستاگلاندین‌ها با آرتریت در ارتباط است. طبق رسوم، درمان آرتریت با استفاده از آسپیرین و سایر داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی صورت گرفته است که از طریق مهار سیکلواکسیژنازها سبب کاهش مقادیر پروستاگلاندین‌های «بد» ایجاد-کننده علائم مربوطه می‌شوند. یک مشکل جدی این داروها، ایجاد خونریزی گوارشی و پرفوراسیون ناشی از کاهش همزمان در پروستاگلاندین‌های «خوبی» است که اثر حفاظتی برای مخاط گوارشی دارند.

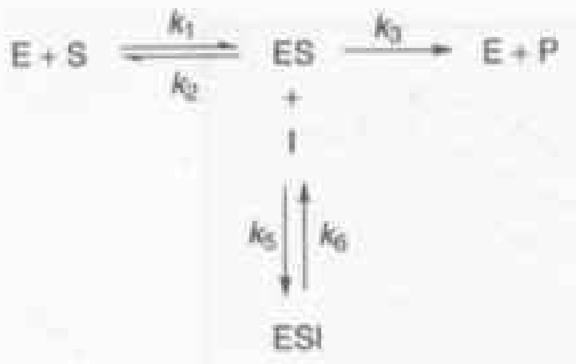
دو سیکلواکسیژناز مختلف، شامل COX-1 و COX-2، وجود دارند که انتشار بافتی آنها متفاوت است. آنزیم COX-2 توسط مدیاتورهای مربوط به حالت آرتریتی القاء می‌شود، در حالی‌که COX-1 به‌طور دائمی پروستا-گلاندین‌های حفظ‌کننده-مخاط را سنتز می‌کند. تنها تفاوت مهم جایگاه‌هایی فعال این دو آنزیم این است که COX-2 یک والین به‌جای ایزولوسین در ریشه ۵۲۳ دارد. والین کوچکتر امکان اتصال ترجیحی مهارکننده‌های مشتری‌پسندی را فراهم می‌سازد که نتیجه آن مهار انتخابی COX-2 می‌باشد. VIOXX® به‌عنوان یکی از انواع این داروهای مشتری‌پسند در داخل جایگاه فعال COX-1 نشان داده شده است.

زنجیرهای جانبی اسید آمینه‌ای کلیدی تولیدکننده پاکت اتصال به سوبسترا با رنگ قرمز و هم که در سنتز پروستاگلاندین شرکت می‌کند، با رنگ آبی مشخص شده‌اند. نشان داده شده است که آسپیرین سرین ۵۳۰ را در هر دو COX-1 و COX-2 استیله می‌کند، در حالی‌که VIOXX® به‌طور انتخابی به COX-2 اتصال یافته و آن را مهار می‌کند، لذا مانع تولید پروستاگلاندین‌های «خوب» توسط COX-1 نمی‌شود. موقعیتی که گروه فنیل آسپیرین در جایگاه فعال اشغال می‌کند همانند موقعیتی است که توسط گروه پرنیل VIOXX® اشغال می‌شود. در ابتدا داروهای VIOXX® - مانند به‌عنوان مهارکننده‌های رقابتی نمایان شدند. هرچند، با COX-2 و نه COX-1، یک مهار غیرقابل برگشت وابسته به زمان رخ می‌دهد که مستلزم تشکیل پیوند کووالان نیست. VIOXX® در سال ۲۰۰۰ به بازار عرضه شد و تفاوت زیادی را در کیفیت زندگی مبتلایان به آرتریت به‌وجود آورد. متأسفانه، عوارض جانبی قابل‌توجهی نظیر عوارض قلبی در برخی بیماران به‌وجود آمده است که سبب جمع‌آوری این دارو از داروخانه‌ها شد.





تفاوت یک اسید آمینه‌ای بین سیکلواکسیژناز-۱ (COX-1) و COX-2 سبب معکوس‌سازی اثر مهارکننده‌های اختصاصی COX-2 می‌شود.



شکل ۵۷-۱۰ واکنش یک مهارکننده نارقابتی با کمپلکس آنزیم-سوبسترا.

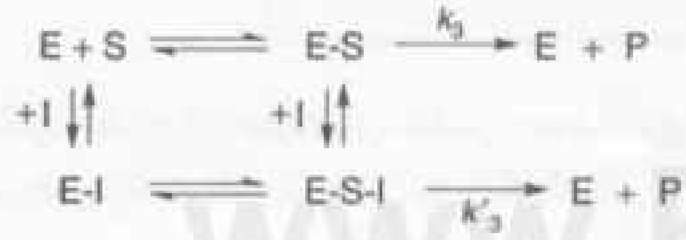
مهار نارقابتی[1]

همان‌طور که در شکل ۵۷-۱۰ نشان داده شده است، یک مهارکننده می‌تواند به کمپلکس ES و نه آنزیم آزاد اتصال یابد. اتصال مهارکننده به جایگاه اتصالی سوبسترا صورت نگرفته و به جایگاه اتصالی دیگری صورت می‌گیرد که مانع اتصال سوبسترا نمی‌شود. معادله میکائیلیس - مِنتِن به صورت زیر خواهد بود

$$v = \frac{V_{max}[S]/(1 + [I]/K_i)}{(K_m + [S])/(1 + [I]/K_i)} \quad (۱۰-۳۳)$$

حال k_{cat} کاهش و بنابراین V_{max} در مقایسه با حالت عدم وجود مهارکننده کاهش می‌یابد و K_{mapp} نیز تغییر می‌کند. این حالت را **مهار نارقابتی** گویند. برخلاف مهار رقابتی، افزایش غلظت سوبسترا بر اثر مهارکننده غلبه نخواهد کرد، زیرا [I] به کمپلکس ES و نه آنزیم آزاد متصل می‌شود.

مهار غیررقابتی[2]



شکل ۵۸-۱۰ واکنش یک مهارکننده غیررقابتی با یک آنزیم.

حالت پیچیده‌تر زمانی رخ می‌دهد که مهارکننده هم به آنزیم آزاد و هم به کمپلکس ES اتصال یابد. برحسب نحوه اثر I بر اتصال سوبسترا و توانایی آنزیم در کاتالیز واکنش، حالات مختلفی می‌توانند ایجاد شود (شکل ۵۸-۱۰). معادله میکائیلیس - مِنتِن بسیار پیچیده است، زیرا ES و ES-I می‌توانند تولید محصول کنند. در صورتی‌که I با تمایل یکسانی به E و ES اتصال یابد، k'_3 صفر است، آنگاه معادله را می‌توان به صورت زیر نوشت

$$v = \frac{V_{max}[S]/(1 + [I]/K_i)}{K_m + [S]} \quad (۱۰-۳۴)$$

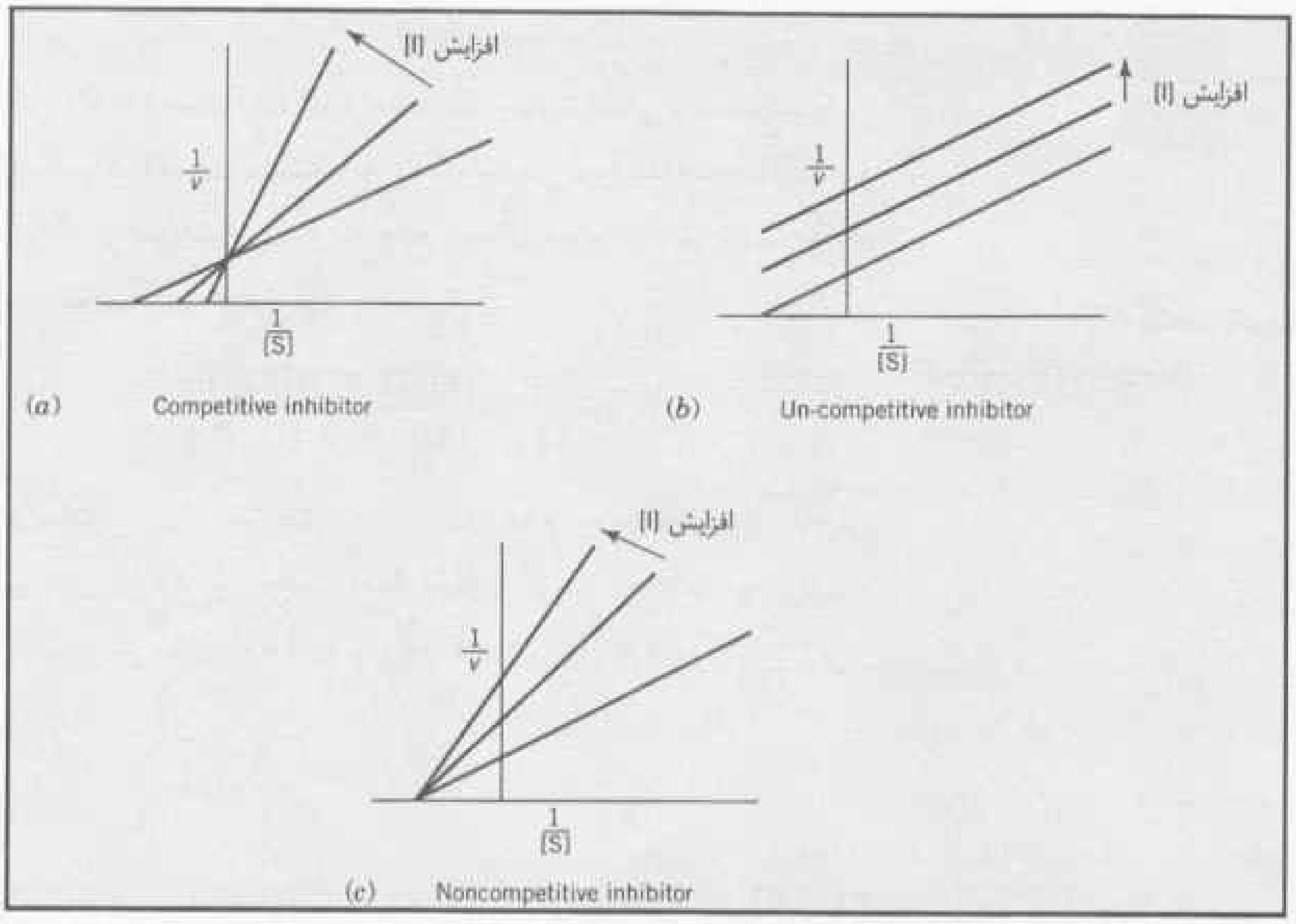
این نحوه اتصال منجر به مهار فعالیت در حضور حتی غلظت‌های بالای [S] می‌شود. در صورتی‌که k'_3 صفر نباشد، حالت متفاوتی حاصل می‌شود، زیرا کمپلکس ES-I می‌تواند تولید محصول کند.

نمودارهای لینویور- برک در حضور مهارکننده‌ها

مهارکننده‌های رقابتی و غیررقابتی

معادله میکائیلیس-مِنتِن برای یک واکنش آنزیمی در حضور هر سه نوع متفاوت مهار-کننده‌های قابل‌برگشت، منجر به نمودارهای متقابل دوطرفه مختلف می‌شود (شکل ۵۹-۱۰). علت این است که برحسب نوع مهارکننده مورد آزمایش، عبارت $1+[I]/K_i$ با K_m یا k_{cat} ارتباط خواهد داشت. در مورد یک مهارکننده رقابتی (شکل ۵۹a-۱۰)، V_{max} در غلظت‌های بالای سوبسترا تغییر نخواهد کرد، لذا خطوط سرعت در غیاب و وجود غلظت‌های

1. Uncompetitive inhibition 2. Noncompetitive



شکل ۵۹-۱۰ **نمودارهای معکوس- دوطرفه برای مهارهای رقابتی، نارقابتی و غیررقابتی.** یک مهارکننده رقابتی به جایگاه اتصالی در سوبسترا متصل شده و به شکل مؤثری سبب افزایش K_m برای سوبسترا می‌شود. یک مهارکننده نارقابتی تغییر برابری را در V_{max} و K_m به وجود می‌آورد که نتیجه آن یک خط موازی با خط مربوط به آنزیم مهارنشده می‌باشد. یک مهارکننده برگشت‌پذیر غیررقابتی هم به E و هم به ES، احتمالاً در جایگاهی غیر از جایگاه اتصال به سوبسترا، متصل می‌شود؛ لذا K_m مؤثر افزایش نمی‌یابد، ولی V_{max} ظاهری کاهش نشان می‌دهد. خطوط قرمز در غیاب مهارکننده هستند.

مختلف مهارکننده، بر روی محور y به یکدیگر می‌رسند. با مهارکننده نارقابتی، وقتی غلظت مهارکننده افزایش می‌یابد، مجموعه‌ای از خطوط موازی حاصل می‌شوند، زیرا شیب خط V/K است و هر دو پارامتر V و K عبارت $(1+[I]/K_i)$ را دارند (شکل b ۵۹-۱۰). در مورد مهارکننده غیررقابتی، مهارکننده هم به E و هم به ES متصل می‌شود و نمودار لینویور- برک شامل مجموعه‌ای از خطوطی است که بر روی محور x با یکدیگر تلاقی می‌کنند.

از نمودارهای معکوس دوطرفه می‌توان برای تعیین نحوه اتصال مهارکننده استفاده نمود. از محل‌های تلاقی با محور x و محور y می‌توان V_{mapp} و K_{mapp} را محاسبه نمود. در صورتی‌که K_m یک سوبسترا مشخص باشد، آنگاه K_i مهارکننده‌ها را می‌توان تعیین نمود.

مهارکننده‌های غیررقابتی به شکل مؤثری غلظت آنزیم آزاد را کاهش می‌دهند و بنابراین سرعت را پایین می‌آورند (شکل c ۵۹-۱۰). حتی در صورتی‌که سوبسترا اشباع‌کننده باشد ($[S]>>K_m$)، حداکثر سرعت مشاهده شده کمتر از میزانی خواهد که در غیاب مهارکننده مشاهده می‌گردد. ترکیباتی که از این نوع مهارکننده‌ها هستند، به عنوان دارو مفیدتر هستند، زیرا آنزیم را بدون توجه به غلظت سوبسترا مهار می‌کنند.

مهارکننده‌های مربوط به واکنش‌های دو-سوبسترایی

یک مهارکننده رقابتی یک واکنش دو-سوبسترایی معمولاً یکی از دو سوبسترا را مهار می‌کند. در صورتی‌که این ترکیب تنها به آنزیم آزاد اتصال یابد، در برابر سوبسترای A رقابتی خواهد بود. در صورتی‌که این مهارکننده به کمپلکس E-A اتصال یابد، آنگاه در برابر سوبسترای B رقابت‌کننده است. میزان K_i برای مهارکننده‌های مربوط به واکنش‌های دو-سوبسترایی را می‌توان با تغییر غلظت یک سوبسترا در حضور مقادیر اضافی سوبسترای دیگر تعیین نمود. واکنش‌های مربوط به مهارکننده‌های غیررقابتی همانند واکنش‌های تک-سوبسترایی خواهد بود.

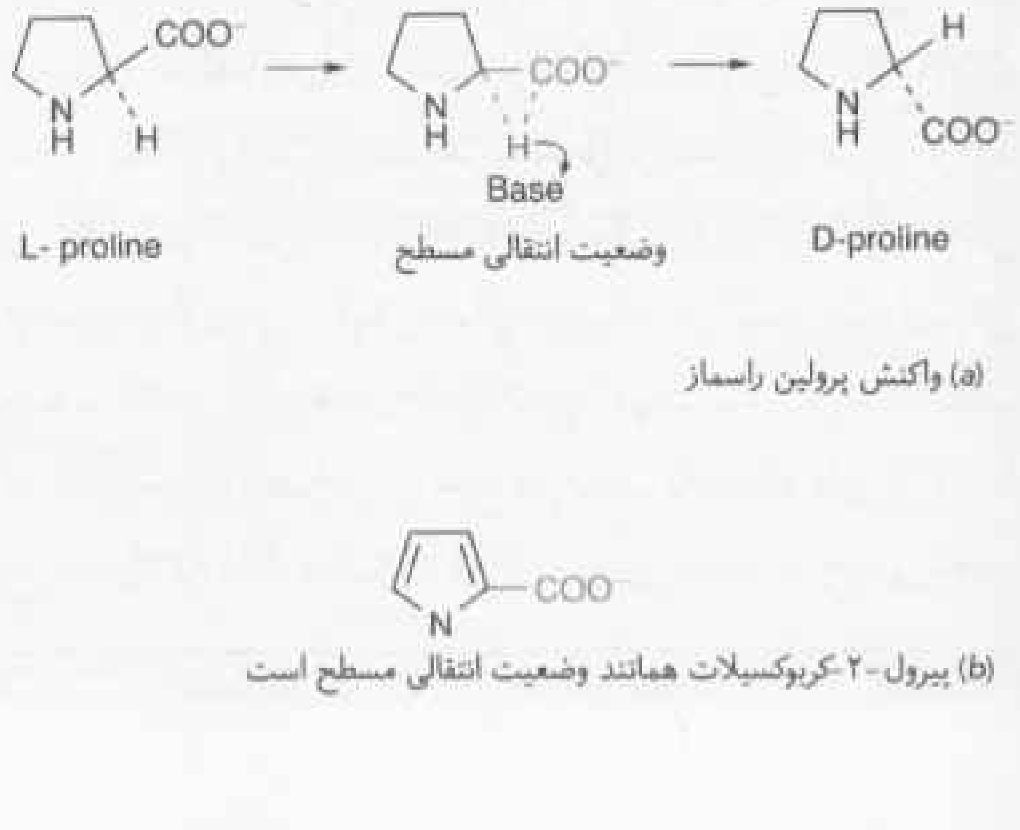
سایر مهارکننده‌ها

مهارکننده‌های حالت-انتقالی

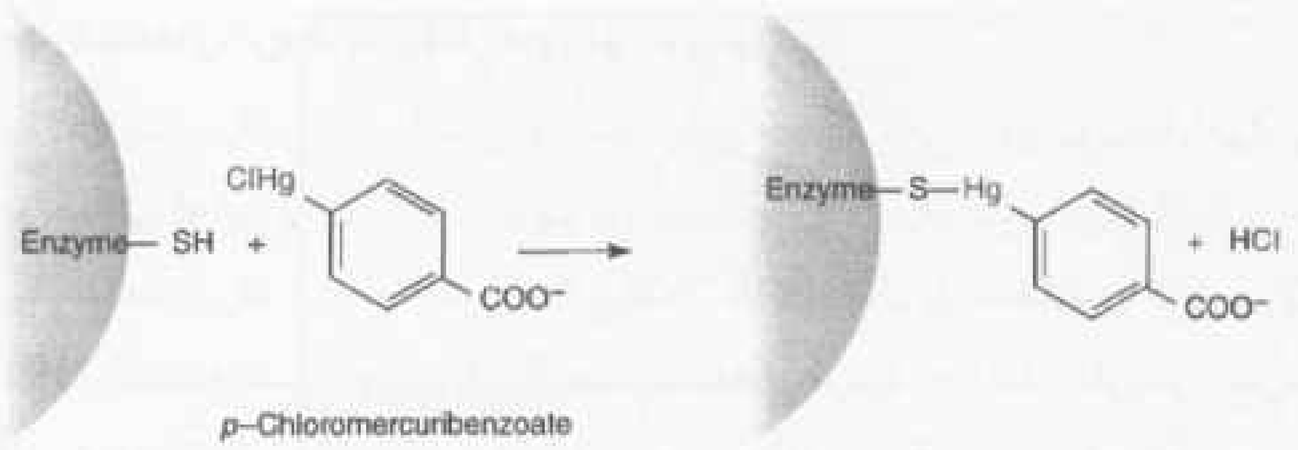
آنزیم‌ها انرژی فعال‌سازی را با تثبیت حالت انتقالی و نه اتصال سوبسترا کاهش می‌دهند. لذا در صورتی‌که یک ترکیب شبیه حالت انتقالی باشد، احتمالاً محکم‌تر از ترکیبی به آنزیم متصل می‌گردد که شبیه سوبسترا است. این مهارکننده‌ها یک میزان K_i بسیار بیشتر از K_m برای سوبسترا دارند. تاکنون هیچکس یک حالت انتقالی را ندیده است، لذا ساختمان‌های فرضی آن براساس شناخت شیمیایی است. مهارکننده پرولین راسماز، مثالی از یک آنالوگ حالت انتقالی است (شکل ۶۰-۱۰). طی واکنش آنزیمی، این سوبسترای چهاروجهی در هنگام تبدیل L- به D- پرولین، مسطح می‌شود؛ پیرول ۲-کربوکسیلات از نظر ساختمانی شبیه حالت انتقالی فرضی است.

مهارکننده‌های مکانیسم-محور یا کشنده

آنزیم‌ها واکنش‌های پیچیده‌ای را انجام می‌دهند که در آنها بسیاری از ترکیبات واسط زودگذر که به صورت سوبسترا وجود دارند، به محصول تبدیل می‌شوند. ترکیباتی سنتز شده‌اند که



شکل ۶۰-۱۰ پیرول-۲-کربوکسیلات از وضعیت انتقالی مسطح تقلید می‌کند و مهارکننده فوق‌العاده‌ای برای پرولین راسماز است.



شکل ۶۱-۱۰ مهار آنزیمی توسط تغییر کووالان یک سیستئین جایگاه فعال.

آنزیم یک مرحله ابتدایی واکنش را بر روی آنها انجام می‌دهد که سبب تبدیل سوبسترا به شکلی می‌شود که به‌طور کووالان متصل به آنزیم باقی خواهد ماند. فعالیت این آنزیم از بین رفته و به همین دلیل به آنها **مهارکننده کشنده**[1] گفته می‌شود.

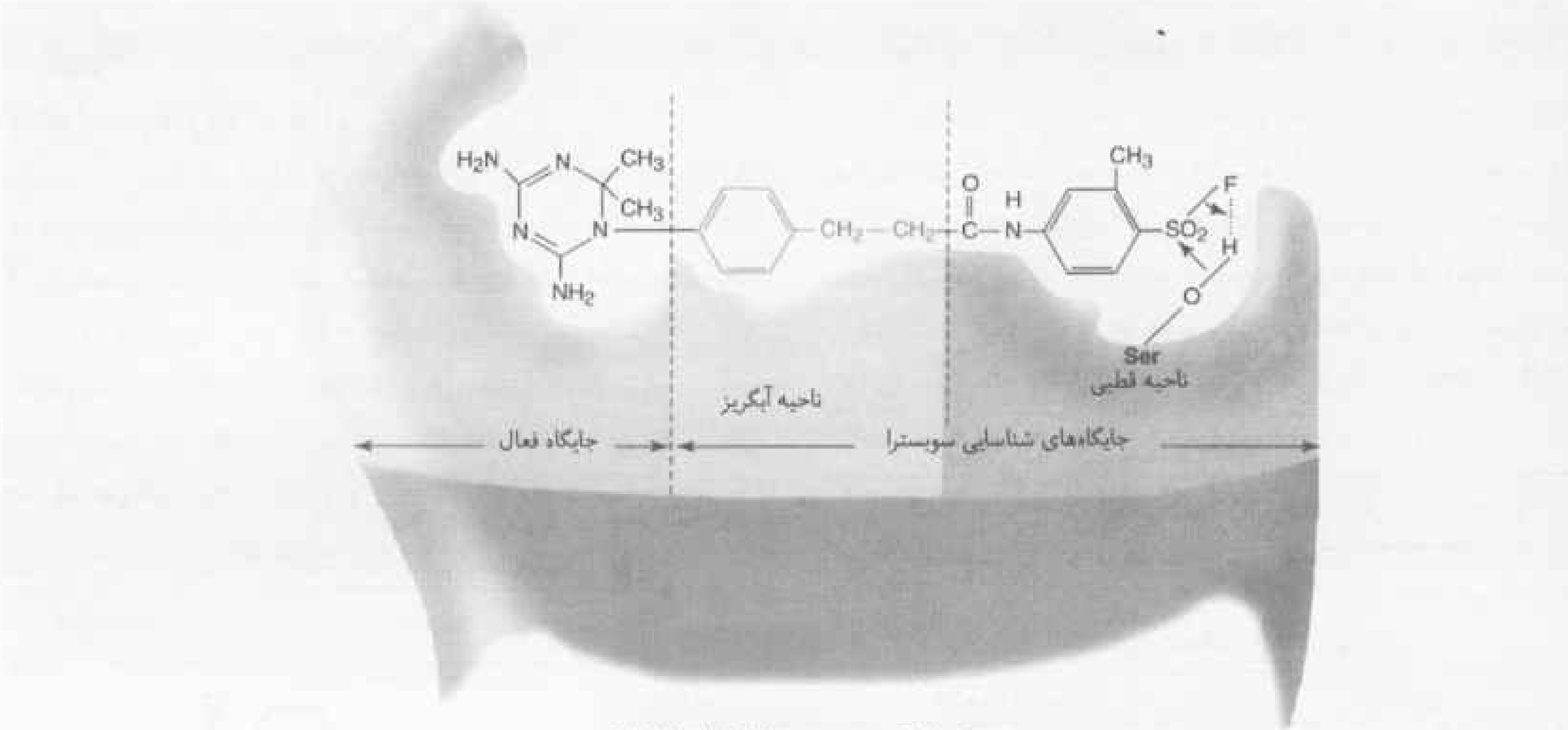
مهارکننده‌های غیرقابل برگشت

ترکیباتی که از نظر شیمیایی آنزیم را تغییر داده و غیرفعال می‌کنند، تحت عنوان **مهارکننده‌های برگشت‌ناپذیر**[2] طبقه‌بندی می‌شوند. اینها با ریشه‌های آمینو اسید واکنش می‌کنند (اشکال ۶۱-۱۰ و ۶۲-۱۰). آسپیرین و آنتابوز[3]، دارویی که به افراد منع شده از مصرف نابجای الکل داده می‌شود، مثال‌هایی از مهارکننده‌های آنزیمی غیرقابل برگشت هستند که کاربرد بالینی دارند (ارتباط بالینی ۹-۱۰ و ۱۰-۱۰).

مهارکننده‌های آنزیمی به عنوان دارو

ترکیبات دارویی جدید از نظر اثر خود بر روی انواع مختلفی از آنزیم‌ها در حال غربال هستند. داروهایی که هدف آنها مهار آنزیم‌های بی‌همتای یک میکروارگانیسم است، کمترین اثرات جانبی را در بیماران به وجود می‌آورند. مثال کلاسیک شامل داروهای سولفا هستند، زیرا باکتری‌ها اسید پارا-آمینوبنزوئیک را به اسید فولیک تبدیل می‌کنند، در حالی که انسان فاقد آنزیم مورد نیاز این واکنش است (شکل ۶۳-۱۰). تفاوت‌های جزئی موجود در بین ایزوزیم‌های مربوط به آنزیم‌های پستانداران برای تولید مهارکننده‌های اختصاصی تحت بررسی شدید قرار دارند. برای مثال، **سیلدنافیل**[4] (نام تجارتی **ویاگرا**[5])، دارویی برای اختلالات مربوط به نعوظ می‌باشد که یک ایزوزیم اختصاصی فسفودی‌استراز را مهار می‌کند (ص. ۶۰۹). احتمال دارد ترکیبی پیدا شود که در آزمایشگاه برای یک آنزیم اختصاصی باشد، ولی ممکن است داروهای دیگری را نیز مهار کند که در فرایند غربالگری مورد آزمایش قرار نگرفته‌اند. داروهای نمونه مهارکننده آنزیم‌ها در جدول ۵-۱۰ فهرست شده‌اند. ارتباطات بالینی ۱۱-۱۰ و ۱۲-۱۰ دو مثال بسیار اختصاصی را شرح می‌دهند. یک نگاه دقیق‌تر ۶-۱۰ روشی را برای تعیین سریع مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌های آنزیمی جدید شرح می‌دهد.

1. Suicide 2. Irreversible 3. Antabuse 4. Sildenafil 5. Viagra



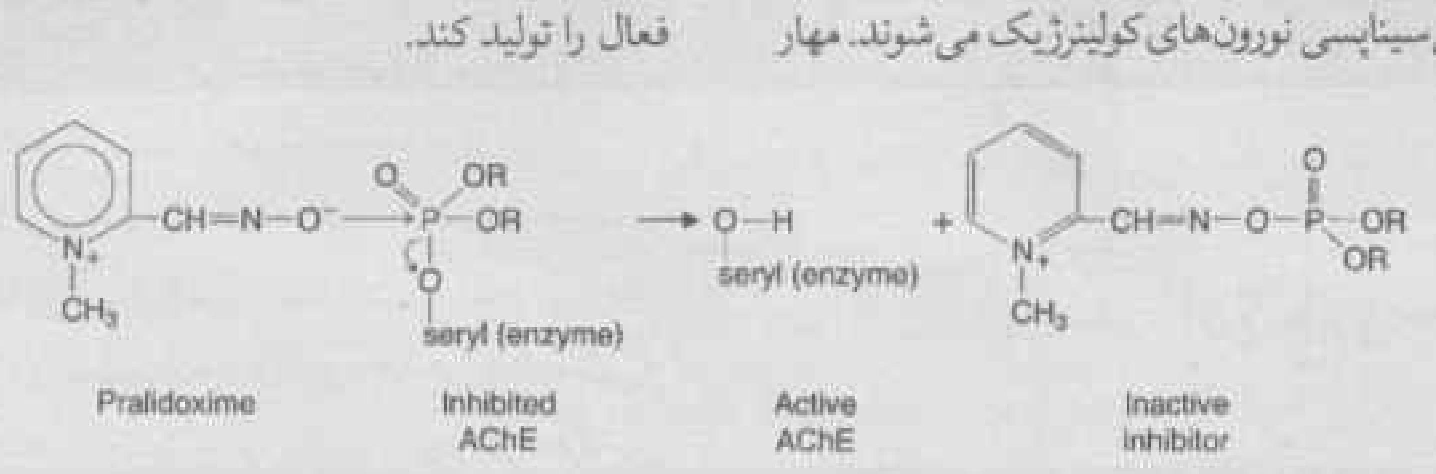
شکل ۶۲-۱۰ غیرفعال‌سازی هدایت‌شده- جایگاهی تتراهیدروفولات ردوکتاز[1]. مهارکننده غیرقابل‌برگشت، یک دی‌هیدروتریازین استخلاف‌شده. از نظر ساختمانی مشابه دی‌هیدروفولات است و به‌طوراختصاصی به جایگاه دی‌هیدروفولات موجود بر روی دی‌هیدروفولات ردوکتاز اتصال می‌یابد. قسمت تریازینی این مهارکننده همانند بخش پترینی است و بنابراین به جایگاه فعال متصل می‌شود. گروه اتیل‌بنزن (قرمز) به جایگاه آبگریزی اتصال می‌یابد که به‌طورطبیعی توسط گروه p- آمینوبنزوئیل اشغال می‌شود. در انتهای واکنشگر این مهارکننده یک سولفونیل فلوراید واکنشگر وجود دارد که یک اتصال کووالان با یک گروه هیدروکسیل سرین در سطح آنزیم برقرار می‌کند. لذا این مهارکننده به‌طوربرگشت‌پذیر با جلوگیری از دسترسی دی‌هیدروفولات به جایگاه فعال، آنزیم را مهار می‌کند. این یک مهارکننده انتصاری نیست، ولی مثالی از یک مهارکننده می‌باشد که به جایگاه فعال اتصال یافته و یک گروه واکنشگر دارد.

([1] به‌نظر می‌رسد نام «دی‌هیدروفولات ردوکتاز» صحیح است. مترجم)

ارتباط بالینی ۹-۱۰

موردی از مسمومیّت

کارکنان بخش اورژانس با موارد متعددی از مسمومیت مربوط به آفت‌کش‌ها مواجه می‌شوند، لذا لازم است قادر به شناسایی و درمان این موارد باشند. بسیاری از حشره‌کش‌های معمولی ترکیبات ارگانوفسفره هستند که از طریق ایجاد استرهای فسفات پایدار با یک ریشه سرین اختصاصی موجود در جایگاه استراز سبب مهار برگشت‌ناپذیر فعالیت استیل‌کولین استراز (AChE) در فیبرهای پس‌سیناپسی نورون‌های کولینرژیک می‌شوند. مهار AChE مانع هیدرولیز استیل‌کولین در سیناپس می‌شود که نتیجه آن تحریک دائمی اعضاء انتهایی این نورون‌ها است. برجسته‌ترین اثرات مسمومیت آفت‌کش‌ها در انسان شامل فلج عضلات تنفسی و ادم ریوی است. در صورت تجویز زودرس، دارویی نظیر پرالیدوکسیم می‌تواند جایگزین آلکیل فسفات آفت‌کش متصل به سرین جایگاه فعال شده و دوباره AchE فعال را تولید کند.



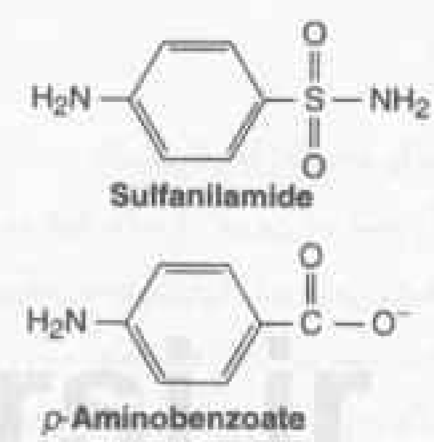
ارتباط بالینی ۱۰-۱۰

متابولیسم قارچ‌ها و الکل

کوپرین[1] به عنوان سم تولیدی توسط قارچ کلاه سیاه[2] با آلدئید دهیدروژناز که در متابولیسم الکل دخالت دارد، یک پیوند کووالان به وجود می‌آورد. کوپرین معمولاً زیاد سمی نیست، مگر در افرادی که ضمن مصرف مشروبات الکلی، قارچ نیز می‌خورند. این افراد دچار یک واکنش سمی به‌صورت تجمع استالدئید حاصل از اکسیداسیون اتانل می‌شوند.

دی‌سولفورام[3] به‌عنوان دارویی که در جلوگیری از مصرف نابجای الکل مصرف می‌شود و تحت عنوان ®Antabuse به فروش می‌رسد، نیز یک مهارکننده کووالان آلدئید دهیدروژناز است و این دارو در صورتی‌که بیمار الکل مصرف کند، سبب بیماری وی می‌شود. دی‌سولفورام در ابتدا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در صنعت لاستیک مصرف می‌شد که در آنجا مشاهد شده این ترکیب در کارکنانی که بعد از کار مشروب خورده‌اند سبب بیماری می‌شود. این مهارکننده از آنزیم جدا نمی‌شود و تنها راه برگرداندن فعالیت آنزیمی، بیوسنتز آنزیم جدید در بافت است.

1. Coprine 2. Inky cap 3. Disulfuram



شکل ۶۳-۱۰ ساختمان- آمینوبنزوات و سولفانیلامید. یک مهارکننده رقابتی یک آنزیم باکتریایی درگیر در سنتز اسید فولیک.

جدول ۵-۱۰ • نمونه‌هایی از داروهایی که آنزیم‌های اختصاصی را مهار می‌کنند

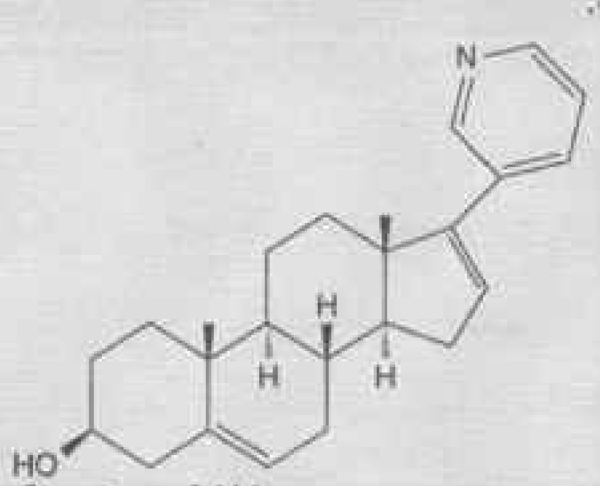
دارو	هدف آنزیمی	بیماری
شیمی درمانی سرطان	Topoisomerase 2	Amrubicin®
الکلیسم	Aldehyde Dehydrogenase	Antabuse®
فشار خون بالا	Angiotensin-converting enzyme	Captopril®
التهاب مفصل	Cyclooxygenase-2	Celebrex®
مشکلات قلبی	Na^+-K^+-Exchanging ATPase	Digoxin®
شیمی درمانی سرطان	Topoisomerase 1	Hycamtin®
کلسترول بالا	3-hydroxy-3-methylglutary l CoA	Lipitor®
اختلال در نعوظ	Phosphodiesterase 5	Viagra®

ارتباط بالینی ۱۱-۱۰

تستوسترون و سرطان پروستات

سرطان پروستات یکی از معمول‌ترین سرطان‌ها است که تنها در مردان دیده می‌شود. طی مراحل ابتدایی بیماری، این تومور نیاز به تستوسترون دارد. با گذشت زمان، سلول‌های توموری دچار جهشی می‌شوند که نتیجه آن عدم نیاز به تستوسترون می‌باشد. این سلول‌های توموری را سلول‌های سرکش نسبت به هورمون می‌نامند. برخی محققین احساس می‌کنند که حتی در مراحل ابتدایی این بیماری، تعدادی سلول سرکش نسبت به هورمون وجود دارد.

محققین تصور می‌کنند که سلول‌هایی که آنها معتقدند نسبت به هورمون سرکش هستند، در واقع به مقادیر بسیار کمی از تستوسترون پاسخ می‌دهند که ممکن است حتی بعد از برداشت بیضه (به طریق جراحی یا شیمیایی) وجود داشته باشند. یک رهیافت جدید برای مبارزه با بیماری سرکشی نسبت به هورمون، استفاده از یک مهارکننده سیتوکروم P450(Cyp17A1) است که به‌عنوان یک آنزیم در بیوسنتز هورمون نقش دارد. آبیراترون به عنوان یک مهارکننده مسیر غیربیضه‌ای تستوسترون در بدن مورد آزمایش قرار گرفته است.



Structure of Abiraterone

ارتباط بالینی ۱۲-۱۰

محصولات طبیعی به‌عنوان مهارکننده‌های آنزیمی

برخی میوجات حاوی ترکیباتی هستند که بر روی متابولیسم داروهای اختصاصی تأثیر می‌گذارند. شاید بهترین تداخل مطالعه‌شده در مورد گریپ‌فروت[1] می‌باشد. این میوه کلاسی از ترکیبات آلی تحت عنوان فورانوکومارین‌ها را دارد و مشخص شده است که برخی از آنها یک سیتوکروم P450(CYP3A4) را در روده، ولی نه در کبد، مهار می‌کنند. تعدادی از داروهای استاتینی مورد استفاده در درمان کلسترول بالا و برخی داروهای مورد استفاده در درمان فشار خون، تا حدودی در روده متابولیزه می‌شوند و نیاز به CYP3A4 دارند. مصرف گریپ‌فروت در هنگام مصرف این داروها سبب تغییر فارماکوکینتیک انواع مختلفی از داروها می‌شود و ممکن است همراه با عوارض شومی باشد.

برخلاف اثر عصاره گریپ‌فروت برای CYP3A4، مطالعات نشان داده‌اند که به دلیل داشتن آنتی‌اکسیدان، این عصاره اثرات شناخته‌شده خوبی بر روی بدن دارد. اثر گریپ‌فروت طی مطالعه تداخل اتانل با داروی تجویزی فشار خون تحت عنوان فلودیپین[2] (با نام برند Plendil®) کشف شد. عصاره گریپ‌فروت همراه با اتانل مصرف می‌شد و نهایتاً محققین دریافتند که مهار متابولیسم این دارو ناشی از عصاره گریپ فروت و نه اتانل است.

1. Grapefruit   2. Felodipine

یک نگاه دقیق‌تر ۶-۱۰

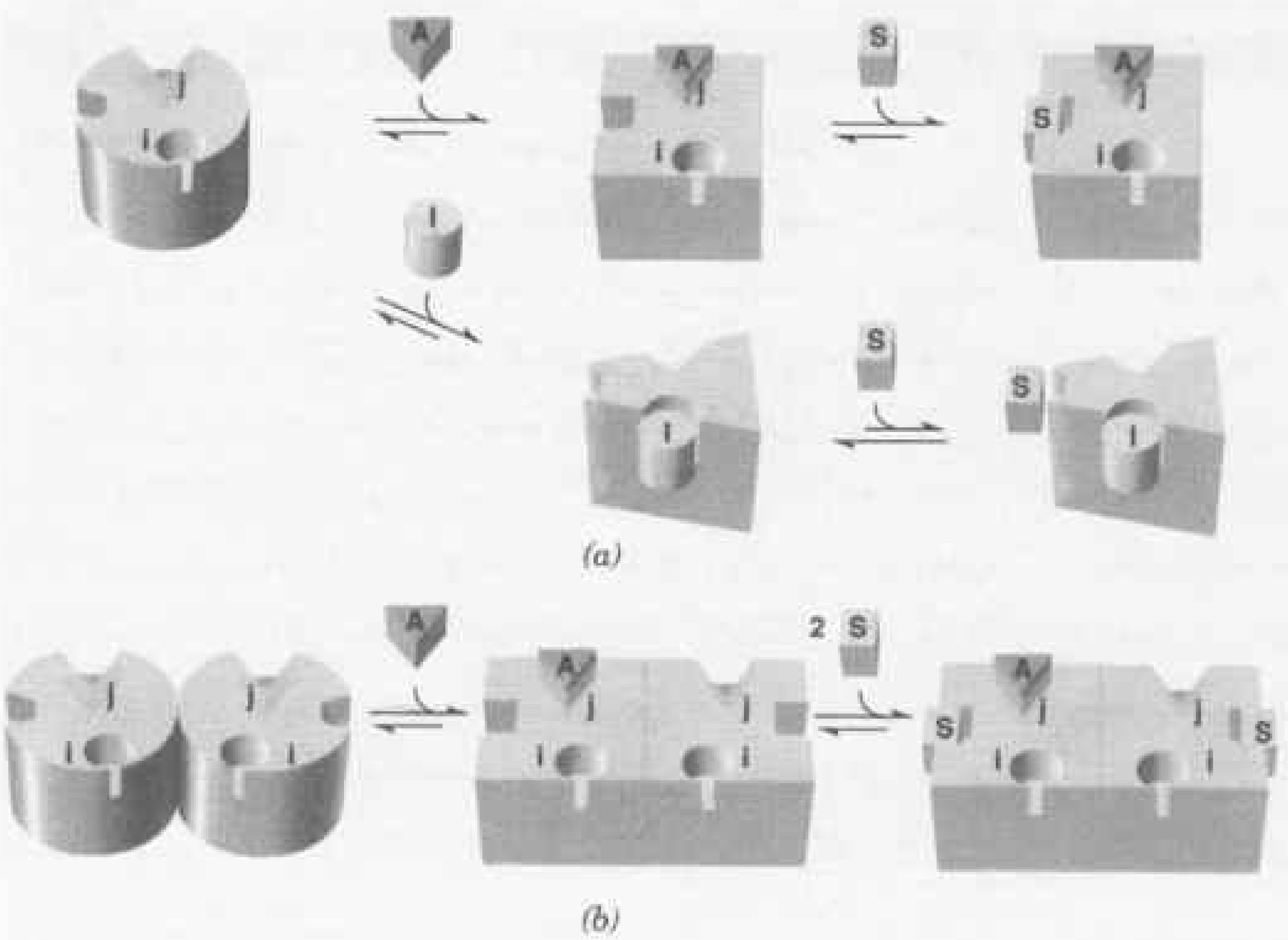
غربالگری با کارایی - بالا در جهت یافتن مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌های آنزیمی

مهارکننده‌های آنزیمی در ترکیبات طبیعی موجود در گیاهان، باکتری‌ها و کپک یافت شده‌اند. برای جستجوی مهارکننده‌های آنزیمی جدید، به خصوص در صنعت داروسازی، از یک غربالگری شیمیایی - کتابخانه‌ای استفاده می‌شود. ده‌ها هزار ترکیب و عصاره محصولات طبیعی سریعاً از نظر توانایی در مهار یک آنزیم و اثر بر روی عملکرد سلول مورد آزمایش قرار می‌گیرند. ترکیب‌های مختلف مواد آزمایش با استفاده از روبوت‌ها به سیستم آزمایش اضافه می‌شوند. سپس آنهایی‌که بر روی آنزیم اثر دارند مورد آنالیز قرار می‌گیرند تا ترکیبات شیمیایی دارای فعالیت بیولوژیکی را بتوان شناسایی نمود. مزیت این رهیافت این است که بدون داشتن تفکر قبلی در خصوص ساختمان احتمالی افکتور، می‌توان ترکیباتی با انواع مختلف ساختمان‌ها را ساخت. براساس نوع آزمون می‌توان هر نوع افکتوری را آزمون نمود.

۱۰-۱۰ • تنظیم فعالیت آنزیمی

تغییر کووالان

سلول‌ها توانایی تنظیم فعالیت آنزیم‌های کلیدی از طریق تغییر کووالان پروتئین را دارند. پروتئین کینازهای مختلفی وجود دارند که فسفریلاسیون ریشه‌های سرین، ترئونین یا تیروزین موجود بر روی آنزیم‌ها را کاتالیز می‌کنند و پروتئین فسفریلازها با هیدرولیز این فسفات‌ها را برداشت می‌کنند. برحسب آنزیم، فسفریلاسیون می‌تواند یک آنزیم غیرفعال را فعال یا یک آنزیم فعال را غیرفعال کند. گروه‌هایی نظیر سولفات و استات همچنین قادر به تغییر فعالیت آنزیمی هستند. از آنجایی‌که هم فسفریلاسیون و هم دفسفریلاسیون توسط آنزیم‌ها انجام می‌شود، این تغییر کووالان قابل برگشت، یک راه سریع و مؤثر کنترل فعالیت آنزیمی است.



شکل ۶۴-۱۰ مدل‌هایی برای سیستم‌های آنزیمی آلوستریک. (a) مدلی از یک آنزیم منومری. اتصال یک افکتور آلوستریک مثبت، A (سبز) به جایگاه فعال، j سبب القاء یک کونفورماسیون جدید بر روی این آنزیم می‌شود که تمایل بیشتری برای سوبسترا دارد. اتصال یک افکتور آلوستریک منفی (ارغوانی) به جایگاه مهارکننده، i منجر به ایجاد یک کونفورماسیون آنزیمی می‌شود که کاهش تمایل به سوبسترا (نارنجی) دارد. (b) مدلی برای یک آنزیم آلوستریک پلیمری. اتصال افکتور آلوستریک مثبت A به جایگاه j سبب تغییر آلوستریکی در کونفورماسشیون پروتومری می‌شود که افکتور به آن متصل شده است. این تغییر در کونفورماسیون از طریق تعاملات تعاونی پروتومر - پروتومر به پروتومر دوم انتقال داده می‌شود. تمایل به سوبسترا در هر دو پروتومر افزایش می‌یابد. یک افکتور منفی تمایل هر دو پروتومر به سوبسترا را کاهش می‌دهد.

کنترل آلوستریک فعالیت آنزیمی

فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها از طریق اتصال لیگاندها به جایگاه‌هایی غیر از جایگاه اتصال به سوبسترا در آنزیم قابل تعدیل است. این جایگاه‌ها را جایگاه‌های آلوستریک گویند (شکل ۶۴-۱۰). **آلوستریک**[1] از ریشه یونانی *allo* به معنی «دیگری[2]» مشتق شده است. یک جایگاه آلوستریک یک ناحیه بی‌همتا در آنزیم است که کاملاً از جایگاه اتصالی سوبسترا متفاوت می‌باشد. لیگاندهایی که به جایگاه آلوستریک متصل می‌شوند را افکتورهای آلوستریک یا تعدیل‌کننده[3] گویند و طی دوره واکنش آنزیمی تغییر نمی‌کند. اتصال یک افکتور آلوستریک سبب یک تغییر کونفورماسیونی آنزیم می‌شود، به طوری که تمایل سوبسترا یا سایر لیگاندها نیز تغییر پیدا می‌کند. افکتورهای آلوستریک مثبت (+) سبب افزایش تمایل آنزیم به سوبسترای خود می‌شود. حالت عکس برای افکتورهای آلوستریک منفی (-) صادق است. جایگاه آلوستریکی که افکتور مثبت به آن اتصال می‌یابد را یک جایگاه فعال‌کننده

1. Allosteric 2. The other 3. Modulators

گویند؛ افکتور منفی به یک جایگاه مهارکننده اتصال می‌یابد. وجود جایگاه‌های آلوستریک در ارتباط بالینی ۱۳–۱۰ شرح داده شده است.

براساس اثر افکتور آلوستریک بر روی K_m یا V_{max}، آنزیم‌های آلوستریک به دو کلاس تقسیم می‌شوند. در **کلاس K** افکتور میزان K_m و نه V_{max} را تغییر می‌دهد، در حالی که در **کلاس V** افکتور V_{max} و نه K_m را تغییر می‌دهد. در کلاس K، اتصال یک افکتور منفی به یک جایگاه آلوستریک سبب افزایش K_m برای سوبسترا می‌شود. به‌طور مشابه در آنزیم‌های کلاس V، تغییردهنده‌های آلوستریک مثبت و منفی سبب افزایش یا کاهش سرعت تجزیه کمپلکس ES به محصولات می‌شوند. تعداد کمی آنزیم وجود دارد که در آنها هر دو مقدار K_m و V_{max} تحت تأثیر تغییردهنده قرار می‌گیرد.

از نظر تئوری، یک آنزیم منومریک می‌تواند در پاسخ به یک لیگاند تغییرکننده متحمل یک تبدیل آلوستریک شود (شکل a ۶۴–۱۰). هر چند، تنها تعداد کمی آنزیم آلوستریک منومریک، شامل ریبونوکلئوزید دی‌فسفات ردوکتاز و پیرووات UDP–*N*–استیل گلوکز-آمین ترانسفراز شناخته شده است. اکثر آنزیم‌های آلوستریک اولیگومریک و شامل چندین زیرواحد هستند (شکل b ۶۴–۱۰). اتصال لیگاند به یک پروتومر می‌تواند بر روی اتصال لیگاندها به سایر پروتومرهای موجود در اولیگومر اثر بگذارد. اگر لیگاندی که به جایگاه آلو-ستریک متصل می‌شود، همان سوبسترای آنزیم باشد، این اثر را **تعامل هُموتروپیک**[1] گویند.

تعاملات هُموتروپیک تقریباً همیشه مثبت هستند. یک **تعامل هتروتروپیک** اثر اتصال یک لیگاند به جایگاه آلوستریک بر روی اتصال یک لیگاند متفاوت در جایگاه فعال می‌باشد. تعاملات هتروتروپیک می‌توانند مثبت یا منفی باشند. مثال‌ها شامل اثر یک افکتور منفی بر روی اتصال سوبسترا یا اثر مثبت یک فعال‌کننده آلوستریک بر روی اتصال سوبسترا می‌باشد. اثرات هتروتروپیک و هُموتروپیک در آنزیم‌های اولیگومریک به‌واسطه همکاری[2] بین زیر-واحدها رخ می‌دهد.

اکثر آنزیم‌هایی که در معرض تعدیل آلوستریک قرار دارند، آنزیم‌های محدودکننده-سرعت در مسیرهای متابولیکی هستند و یا در محلی قرار دارند که در آنجا سوبسترا می‌تواند در چندین مسیر مورد استفاده قرار گیرد.

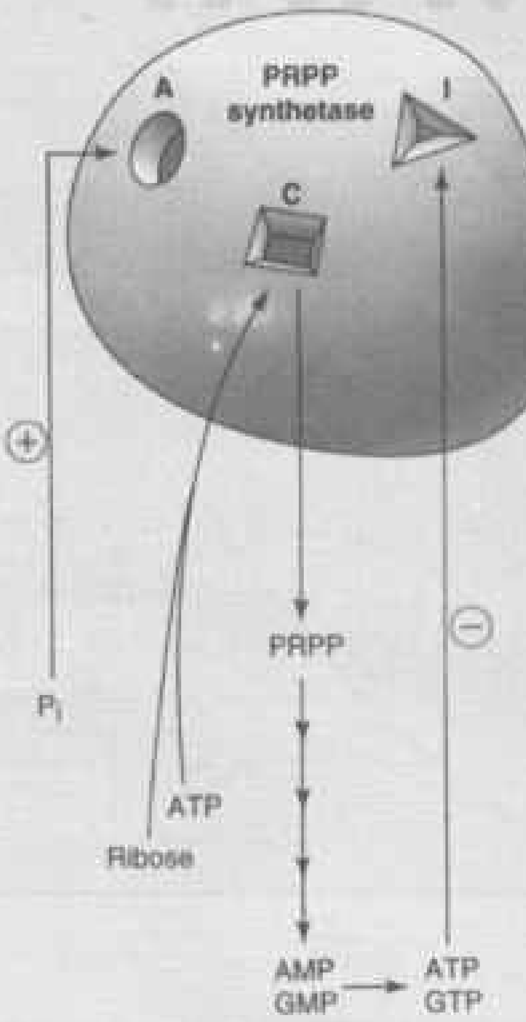
آنزیم‌های چند-زیرواحدی: همکاری

بسیاری از آنزیم‌ها چند زیرواحدی و متشکل از زیرواحدهای منومری یکسان یا متفاوت هستند. زیرواحدهای مربوط به برخی آنزیم‌های چند زیرواحدی مستقل از یکدیگر عمل می‌کنند، که طی آن رویدادی که در یک زیرواحد رخ می‌دهد، تأثیری بر فعالیت زیرواحدهای دیگر ندارد. برای این آنزیم‌ها، مقادیر k_{cat} و V_{max} را می‌توان بر تعداد زیرواحدها تقسیم نمود تا عدد نوسازی واقعی هر زیرواحد به دست آید. در آنزیم‌های چندزیرواحدی دیگر،

ارتباط بالینی ۱۳–۱۰

موردی از نقرس تفاوت بین یک جایگاه آلوستریک و جایگاه اتصالی سوبسترا را نشان می‌دهد

شناخت مجزا بودن جایگاه‌های مهاری آلوستریک از جایگاه‌های تحریکی آلوستریک و همچنین از جایگاه‌های اتصال به سوبسترا و کاتالیتیک، حاصل مطالعه‌ای بر روی یک بیمار مبتلا به نقرس بود که افزایش میزان PRPP گلبول قرمز را داشت. مشخص شد که PRPP سنتتاز این بیمار دارای مقادیر K_m و V_{max} طبیعی به همراه حساسیت به فعال‌سازی توسط فسفات است. دلیل افزایش مقادیر PRPP و هیپراوریسمی این بود که محصولات انتهایی مسیر (GTP ،ATP) قادر به مهار این سنتتاز از طریق جایگاه مهاری آلوستریک نبودند. پیشنهاد شده است که یک جهش در جایگاه مهاری یا در مکانیسم جفت‌شدن بین جایگاه مهاری و کاتالیتیک منجر به نارسایی در مکانیسم کنترلی پس‌نوردی می‌شود.



یک فسفوریبوزیل پیروفسفات سنتتاز اریتروسیت انسانی که دچار جهش منتهی به تغییر خصوصیات تنظیمی می‌باشد.

---

1. Homotropic interaction
2. Cooperativity

ارتباط بالینی ۱۴-۱۰

ابهام در آزمون آنزیم‌های جهش‌یافته

اغلب جهش‌هایی در ژن‌های ساختمانی مشاهده می‌شوند که منتهی به تولید آنزیم‌هایی با مقادیر افزایش‌یافته یا کاهش‌یافته K_m می‌گردند. یکی از این موارد، بیمار مبتلا به هیپراوریسمی و نقرس می‌باشد که هیپوگزانتین-گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HGPRT) آن فعالیت کمی را در آزمایش‌های داخل آزمایشگاه نشان می‌دهد. این آنزیم در بازیافت بازهای پورینی و کاتالیز واکنش زیر نقش دارد

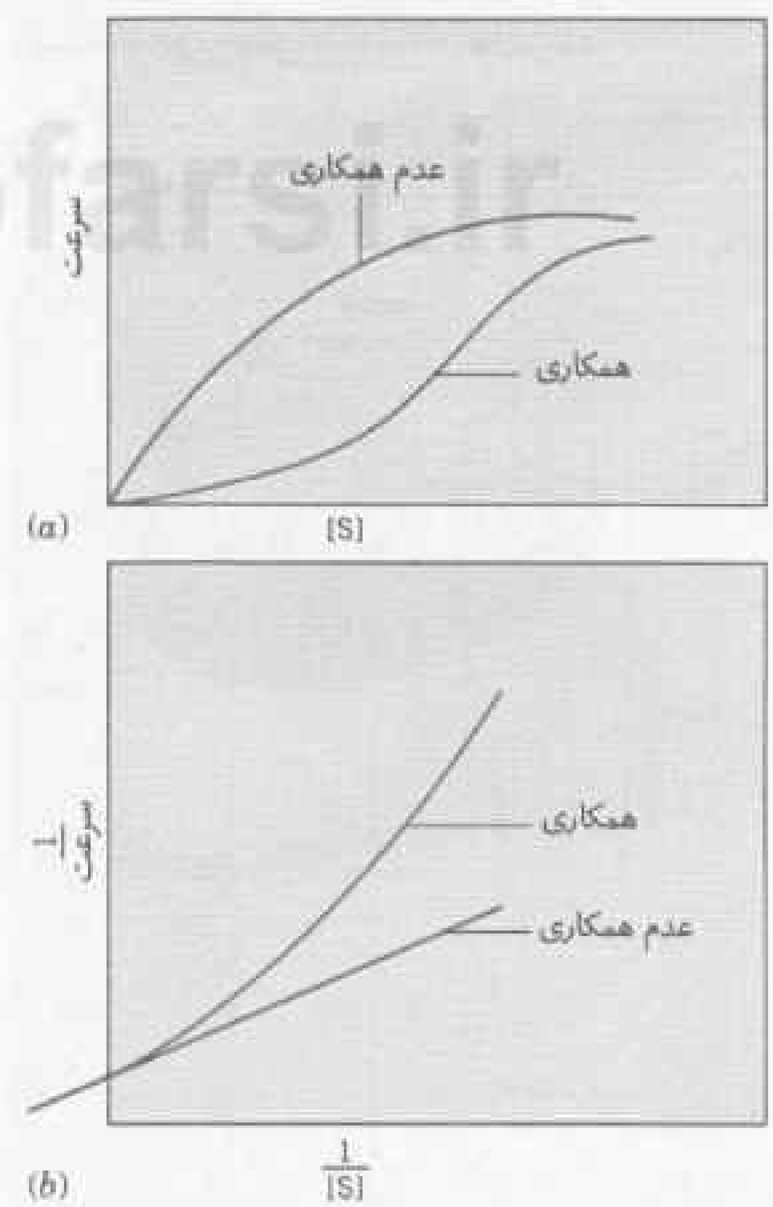
Hypoxanthine + PRPP → inosine monophosphate + PPi

که در آن PRPP فسفوریبوزیل پیروفسفات است.

عدم وجود فعالیت HGPRTase منجر به یک ناهنجاری عصبی شدید تحت عنوان سندروم لیش- نیهان (ص ۱۰۸۸) می‌شود، در حالی‌که بیمار فوق فاقد نشانه‌های بالینی معمول این ناهنجاری بود. آزمایش ایمونولوژیکی با استفاده از یک آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنزیم، مواد بیشتری با واکنش-متقاطع را در گلبول‌های قرمز خون این بیمار در مقایسه با کنترل‌های طبیعی آشکار نمود که نشان داد این آنزیم سنتز می‌شد ولی در آزمون داخل آزمایشگاه غیرفعال بود. با افزایش غلظت سوبسترا در آزمون، همولیزات گلبول قرمز بیمار فعالیت کامل را به‌دست آورد. این آنومالی واضحاً ناشی از جهشی در جایگاه اتصال به سوبسترای HGPRTase می‌باشد که منجر به افزایش K_m می‌شود. غلظت سوبسترای موجود در آزمون استاندارد و در گلبول‌های قرمز خون به اندازه کافی بالا نبود که به آنزیم اتصال یابد. این مورد تأکیدی بر این نکته است که تعیین مقدار صحیح یک آنزیم وابسته به کینتیک درجه-صفر، یعنی، اشباع آنزیم با سوبسترا، می‌باشد.

یک رویداد در یک زیرواحد بر توانایی فعالیتی زیرواحدهای مجاور تأثیر می‌گذارد. در این حالات، K_m سوبسترا معمولاً تغییر پیدا می‌کند، ولی در برخی موارد k_{cat} تغییر می‌یابد (ارتباط بالینی ۱۴-۱۰).

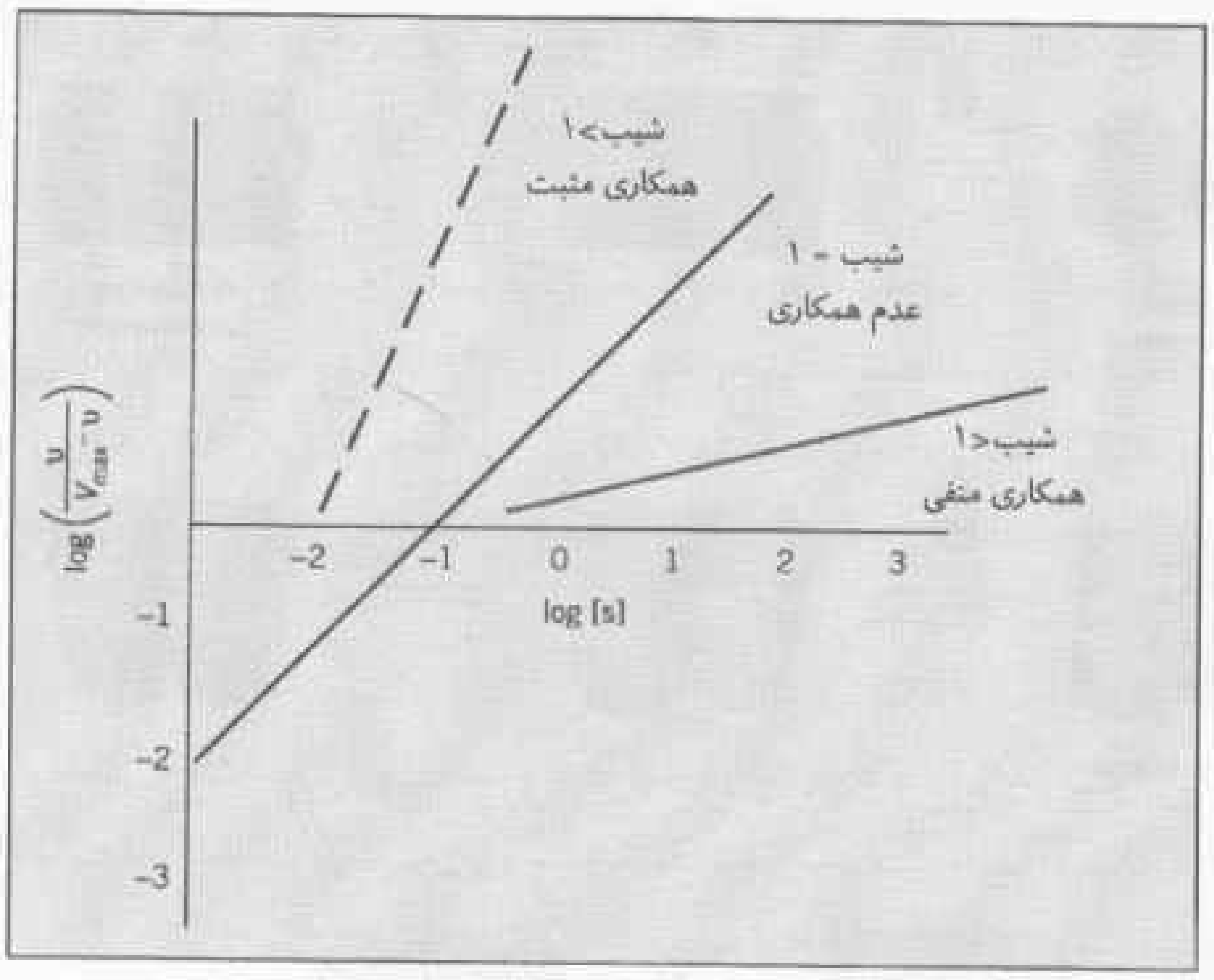
یک زیرواحد در حالت مولتیمری می‌تواند از طریق تغییر کونفورماسیون زیرواحدها بعد از اتصال سوبسترا به آن، بر روی خصوصیات زیرواحد مجاور اثر بگذارد (شکل ۶۴a-۱۰). این منومر تغییریافته می‌تواند راحت‌تر به سوبسترا متصل شود و از اینرو بدون افزایش غلظت سوبسترا، اشباع‌تر شود. در صورتی‌که اتصال ساده‌تر شود (کاهش K_m)، آنگاه گفته می‌شود که آنزیم **همکاری مثبت** را نشان می‌دهد؛ این حالت مشابه اتصال اکسیژن به هموگلوبین است (ص.۴۸۷). وقتی تغییر ساختمانی سبب می‌شود تا اتصال سوبسترا به زیرواحد دوم سخت‌تر شود (افزایش در K_m)، آنگاه گفته می‌شود که آنزیم **همکاری منفی** دارد.



شکل ۶۵-۱۰ نمودارهای مربوط به آنزیم‌هایی که همکاری (تعاونی) را نشان می‌دهند، غیرمعمول است. (a) نمودار سرعت در برابر غلظت سوبسترا و (b) نمودار معکوس - دوطرفه. منحنی‌های تعاونی برای همکاری مثبت می‌باشد.

برای بررسی آنزیمی که همکاری را نشان می‌دهد، نمودار سرعت در برابر [S] رسم می‌شود. این منحنی، به‌جای هیپربولیک، سیگموئیدی است (شکل ۶۵a-۱۰)، و نمودار معکوس دوطرفه خطی نخواهد بود (شکل ۵۶b-۱۰). به این دلیل این حالت مشاهده می‌گردد که K_m با تغییر در غلظت سوبسترا، تغییر می‌یابد.

محاسبه دقیق K_m آنزیمی که همکاری مثبت یا منفی را نشان می‌دهد، بسیار مشکل است. هر چند، این میزان براساس غلظت سوبسترایی قابل برآورد است که v برابر نصف V_{max} را ایجاد می‌کند؛ این را $K_{0.5}$ گویند. معادله هیل که برای تشریح اتصال تعاونی (همکاری) اکسیژن به هموگلوبین مورد استفاده قرار گرفت (ص. ۴۸۶)، برای محاسبه ضریب هیل



شکل ۶۶-۱۰ نمودار هیل برای یک آنزیم آلوستریک.

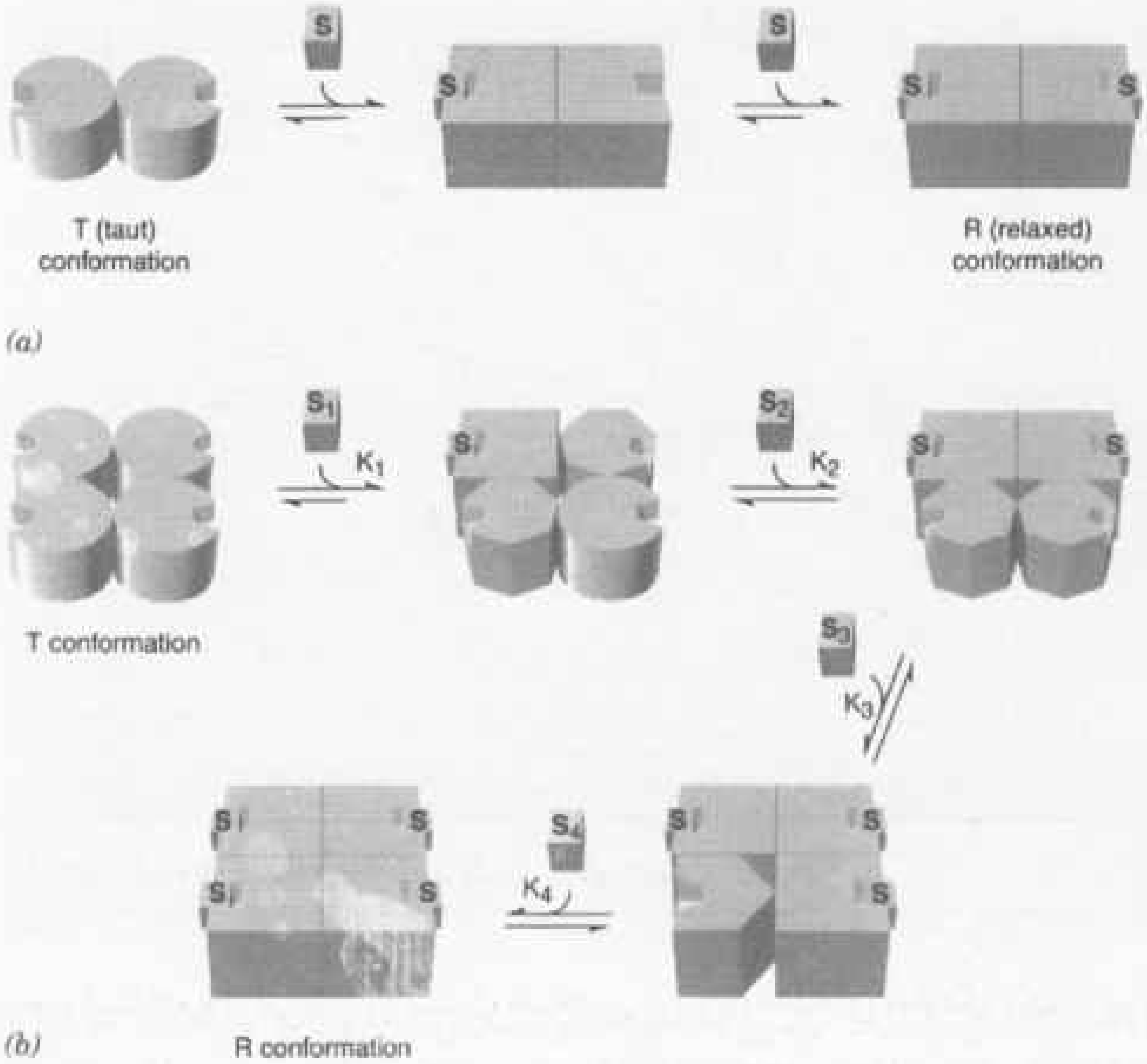
مورد استفاده قرار می‌گیرد که شدت همکاری بین زیرواحدهای تعاملگر یک آنزیم را برآورد می‌کند. مقادیر کمتر از ۱، همکاری منفی را نشان می‌دهد، و مقادیر بیش از ۱ نشان‌دهنده همکاری مثبت است. نمونه مثال‌های مربوط به همکاری مثبت و منفی در شکل ۶۶-۱۰ آورده شده است.

مدل‌های تشریح همکاری

دو مدل برای تشریح همکاری وجود دارد. هر دوی این مدل‌ها از این مقدمه استفاده می‌کنند که تعاملاتی بین زیرواحدها وجود دارد و کونفورماسیون زیرواحدی متصل به یک لیگاند متفاوت از کونفورماسیون زیرواحد در غیاب لیگاند است. تفاوت اصلی بین این مدل‌ها در این است که آیا این دو کونفورماسیون از قبل وجود دارند و یا این که تنها بعد از اتصال لیگاند به وجود می‌آیند.

در **مدل متوالی**[1] تصور بر این است که وقتی لیگاند به یک زیرواحد (A) اتصال می‌یابد، تغییری در کونفورماسیون آن رخ می‌دهد که سبب القاء یک تغییر کونفورماسیونی در زیرواحد مجاور (B) می‌گردد. اثر اتصال لیگاند به‌طور متوالی از طریق فصل مشترک زیرواحدها انتقال یافته و سبب افزایش یا کاهش تمایل B به لیگاند می‌شود (شکل a ۶۷-۱۰). در این مدل، حالات هیبرید متعددی حاصل شده که منجر به افزایش همکاری و نمودارهای سیگموئیدی سرعت در برابر [S] می‌شود. هر دو همکاری مثبت و منفی می‌توانند با این مدل سازگار باشند. تعدیل‌کننده‌های آلوستریک مثبت می‌توانند یک کونفورماسیون را در

1. Sequential model



شکل ۶۷-۱۰ مدل‌هایی برای همکاری (تعاونی). (*a*) مدل هماهنگ. آنزیم تنها به دو حالت، شامل کونفورماسیون‌های T (سخت) و R (شُل)، وجود دارد. سوبستراها و فعال‌کننده‌ها تمایل بیشتری برای حالت R و مهارکننده‌ها برای حالت T دارند. لیگاندها تعادل را بین حالات T و R تغییر می‌دهند. (*b*) مدل متوالی قالب-القاءشده. اتصال یک لیگاند به یکی از زیرواحدها سبب القاء تغییر کونفورماسیونی در زیرواحد دیگر می‌شود. تغییر کونفورماسیونی از طریق تعاملات زیرواحد-زیرواحد به‌طورنسبی به زیرواحدهای مجاور انتقال داده می‌شود. لذا اثر اولین لیگاند اتصال‌یافته به‌طور تعاونی و متوالی به زیرواحدهای (پروتومرهای) دیگر موجود در اولیگومر انتقال می‌یابد که نتیجه آن یک افزایش یا کاهش متوالی تمایل لیگاندی پرتومرهای دیگر است. برحسب نوع لیگاند، این همکاری ممکن است مثبت یا منفی باشد.

یک زیرواحد القاء کنند که افزایش تمایل به سوبسترا را داشته باشد، و یک تعدیل‌کننده منفی کونفورماسیون متفاوتی را در این زیرواحد القاء می‌کند که نتیجه آن کاهش تمایل به سوبسترا می‌باشد. بحث مشابهی را می‌توان برای آنزیم‌هایی داشت که در آنها k_{cat} تغییر می‌کند.

در **مدل هماهنگ**[1] فرض بر این است که در غیاب لیگاند دو کونفورماسیون در تعادل با یکدیگر قرار دارند و با اتصال لیگاندها این تعادل به‌سمت کونفورماسیون متصل به لیگاند کشانده می‌شود. این دو حالت در مدل هماهنگ T (سخت[2]) و R (شل[3]) نامیده می‌شوند (شکل ۶۷-۱۰ *b*). با وجود اینکه هر دو حالت می‌توانند به لیگاند اتصال یابند، در یک حالت اتصال محکم‌تر است. فعال‌کننده‌ها و سوبستراها به حالت R اتصال یافته و تعادل قبلی را به‌سمت حالت R می‌کشانند. با افزایش پروتئین با حالت R، اتصال ملکول سوبسترا یا فعال‌کننده بعدی راحت‌تر انجام می‌شود. برعکس، مهارکننده‌ها حالت T را مساعدت می‌کنند. در حضور یک مهارکننده، اتصال سوبسترا به حالت T مشکل‌تر است. با وجود اینکه این روش رفتار کینتیکی بسیاری از آنزیم‌ها را نشان می‌دهد، ولی نمی‌تواند براحتی همکاری منفی را توجیه کند.

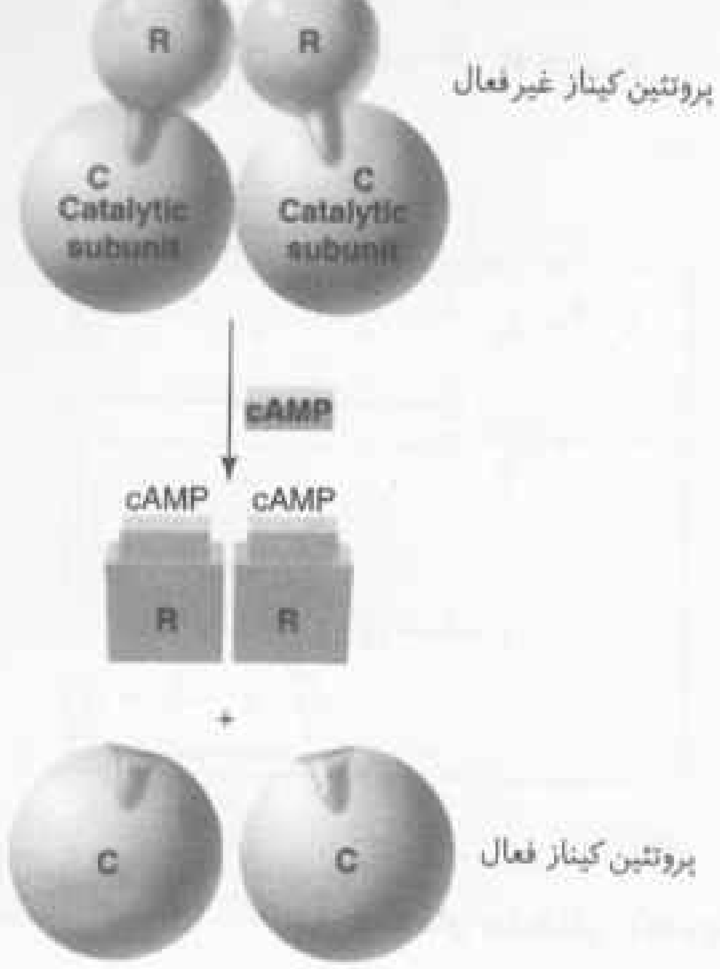
زیرواحدهای تنظیمی فعالیت زیرواحدهای کاتالیتیک را تعدیل می‌کنند

همان‌طور که مورد بحث قرار گرفت، تصور می‌رود که جایگاه اتصال آلوستریک بر روی

1. Concerted model 2. Tense or taut 3. Relaxed

همان زیرواحدی قرار داشته باشد که جایگاه کاتالیتیک وجود دارد، و تمامی زیرواحدها یکسان هستند. در چندین آنزیم یک زیرواحد پروتئینی تنظیمی وجود دارد. این زیرواحدهای تنظیمی (R) فاقد فعالیت کاتالیتیک هستند، ولی اتصال آنها به زیرواحد کاتالیتیک (C) سبب تعدیل فعالیت زیرواحد کاتالیتیک از طریق القاء یک تغییر کونفورماسیونی می‌شود. پروتئین کیناز A با این مکانیسم تنظیم می‌شود (شکل ۶۸-۱۰). در غیاب cAMP، زیرواحد R به زیرواحد C اتصال یافته و سبب مهار فعالیت آنها شود. وقتی cAMP به زیرواحد R متصل می‌شود، یک تغییر کونفورماسیونی در R منجر به جدایی R از C می‌شود. حال این زیرواحد C فعالیت کاتالیتیکی دارد.

کالمودولین (ص. ۶۷۱)، یک پروتئین اتصالی Ca^{2+}، یک زیرواحد تنظیمی برای برخی آنزیم‌هایی است که از Ca^{2+} به‌عنوان تعدیل‌کننده فعالیت خود استفاده می‌کنند. اتصال Ca^{2+} به کالمودولین سبب یک تغییر کونفورماسیونی می‌شود که امکان اتصال آن به آنزیم‌های وابسته به Ca^{2+} را فراهم می‌سازد.



شکل ۶۸-۱۰ مدل آنزیم آلوستریک با زیرواحدهای کاتالیتیکی (C) و تنظیمی (R) مجزا. زیرواحد تنظیمی پروتئین کیناز A حاوی یک ناحیه سوبسترای کاذب در توالی اولیه خود است که به جایگاه سوبسترای زیرواحد کاتالیتیک اتصال می‌یابد. در حضور cAMP، کونفورماسیون زیرواحد R طوری تغییر می‌کند که ناحیه سوبسترای کاذب دیگر اتصال نیافته و در نتیجه زیرواحدهای C فعال آزاد می‌گردند.

۱۱-۱۰ • تنظیم مسیرهای متابولیکی

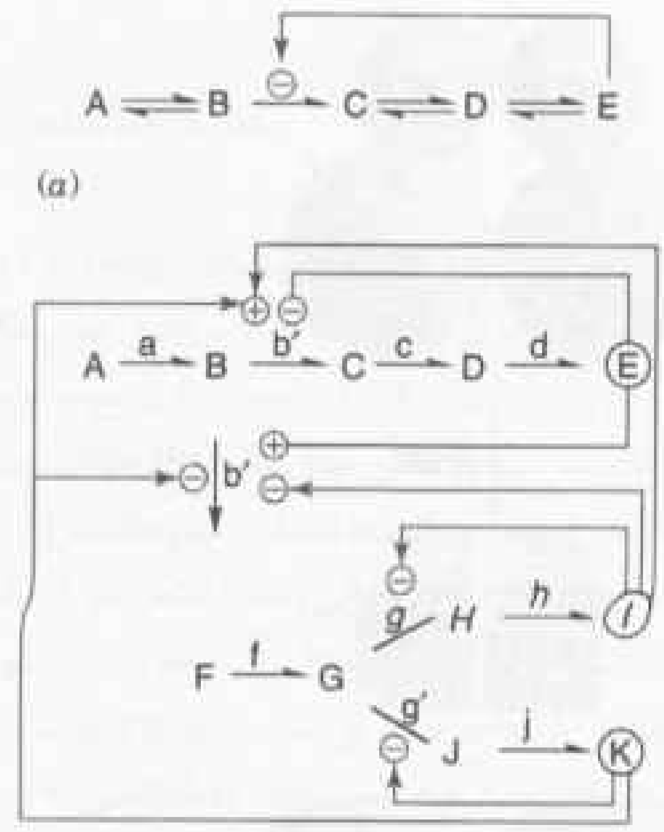
یکپارچگی فیزیولوژیکی بسیاری از آنزیم‌ها در یک مسیر متابولیکی و همچنین ارتباط متقابل محصولات یک مسیر با فعالیت مسیرهای دیگر، تحت کنترل قرار دارد. نیازی به تنظیم فعالیت تمامی آنزیم‌های مسیر نیست. در عوض، تعدیل فعالیت یک یا چند آنزیم کلیدی مسیر کافی می‌باشد. یک واکنش آنزیمی معمولاً آهسته‌تر از سایر واکنش‌ها است. این **مرحله محدودکننده- سرعت**[1] مسیر است. بنابراین، سرعت جریان سوبستراها در این توالی وابسته به یک آنزیم در کل مسیر است. تغییر خصوصیات کینتیکی این آنزیم، اثر زیادی بر روی سرعت تشکیل محصول نهایی دارد.

محل دیگر در تنظیم یک مسیر متابولیکی، اولین واکنش غیرقابل‌برگشت بی‌همتای مسیر می‌باشد؛ این مرحله را **مرحله متعهدکننده** گویند. آنزیم محدودکننده- سرعت لزوماً آنزیمی نیست که مرحله متعهدکننده را کاتالیز می‌کند. به‌علاوه، در برخی مسیرها یک ترکیب واسط به‌عنوان ترکیب واسطی برای دو یا چند مسیر متابولیکی عمل می‌کند که منجر به تولید محصولات مختلف می‌شوند. تنظیم آنزیم‌ها در این نقاط شاخه، جریان متابولیت‌ها در هر دو مسیر را کنترل خواهد کرد. به چند طریق می‌توان فعالیت آنزیمی مرتبط با مرحله متعهدکننده یا مرحله محدودکننده- سرعت را تنظیم نمود.

غلظت سلولی آنزیم

نیمه-عمر بسیاری از آنزیم‌های قابل القاء کمتر از یک ساعت می‌باشد، در حالی که نیمه-عمر بسیاری از آنزیم‌های دائمی چند روز می‌باشد. سلول‌ها غلظت آنزیمی را از طریق

1. Rate-limiting step



شکل ۶۹-۱۰ کنترل مسیرهای متابولیکی. (*a*) مهار پس‌نوردی. محصول E می‌تواند آنزیمی را مهار کند که کاتالیزکننده واکنش B به C است. این واکنش ممکن است غیرقابل‌برگشت یا محدودکننده-سرعت باشد. (*b*) تنظیم یک مسیر کمپلکس فرضی. محصول E می‌تواند آنزیم b را مهار و آنزیم b′ را فعال کند. به‌طور مشابه، محصولات I و K می‌توانند سنتز خود را با مهار آنزیم‌های b′، g (و g′) و فعال‌سازی b، مهار کنند.

تغییر سرعت سنتز از نو در سطح رونویسی یا ترجمه تنظیم می‌کنند. برای مثال، گلوکز سنتز از نو پیرووات کربوکسی‌کیناز را سرکوب می‌کند که آنزیم محدودکننده-سرعت در تبدیل پیرووات به گلوکز است. در صورتی‌که مقادیر کافی گلوکز در خون در دسترس وجود داشته باشد، میزان پیرووات کربوکسی‌کیناز کبدی پایین می‌باشد. مقادیر پایین گلوکز خون منجر به افزایش این آنزیم و افزایش سنتز گلوکز می‌شود.

فعال‌کننده‌ها، مهارکننده‌ها، و تغییر کووالان

تنظیم کوتاه-مدت یک آنزیم از طریق تعدیل فعالیت توسط فعال‌کننده‌ها، مهارکننده‌ها و تغییر کووالان صورت می‌پذیرد. وقتی غلظت داخل سلولی داکسی‌ریبونوکلئوتیدها افزایش می‌یابد به‌طوری که سلول مقادیر کافی آنها را برای سنتز DNA دارد، آنزیم کلیدی این مسیر سنتتیک توسط محصولات انتهایی مسیر مهار می‌شود که نتیجه آن تنظیم در جهت کاهش این مسیر سنتتیک می‌باشد. این را **مهار پس‌نوردی**[1] گویند (شکل *a* ۶۹-۱۰). علاوه بر تنظیم پس‌نوردی موجود در یک مسیر، مهار پس‌نوردی سایر مسیرها نیز می‌تواند رخ دهد. این را **تنظیم-متقاطع**[2] گویند. در اینجا محصولی از یک مسیر به عنوان مهارکننده یا فعال‌کننده آنزیمی عمل می‌کند که در ابتدای مسیر دیگر قرار دارد (شکل *b* ۶۹-۱۰). تولید چهار داکسی ریبونوکلئوتید برای سنتز DNA، مثال خوبی از تنظیم-متقاطع می‌باشد.

بخش‌بندی

بالاخره، فعالیت یک مسیر را می‌توان با تقسیم فیزیکی واکنش‌ها در بخش‌های سلولی اختصاصی تنظیم نمود که توسط غشاءهای غیرقابل‌نفوذ جدا شده‌اند. انتقال سوبستراها، محصولات و کوفاکتورها از عرض غشاءها غلظت آنها را در یک بخش کنترل می‌کند. این باعث تنظیم قابلیت دسترسی شده و می‌تواند فعالیت آنزیمی را محدود کند. این را **بخش‌بندی**[3] گویند. برای مثال، استیل کوآ در داخل میتوکندری تولید می‌شود و برای سنتز اسیدهای چرب می‌بایست به داخل سیتوزول انتقال داده شود. استیل کوآ کربوکسیلاز، اولین مرحله در سنتز اسیدهای چرب، نیاز به استیل کوآ دارد. این سوبسترا نمی‌تواند به داخل سیتوزول انتشار یابد، به همین دلیل یک مکانیسم انتقالی اختصاصی در غشاء وجود دارد (ص. ۹۲۰). به منظور کنترل بهتر، مسیرهای آنابولیک و کاتابولیک اغلب به‌طور مجزا در اندامک‌های مختلف انجام می‌شوند. اکسیداسیون اسیدهای چرب در یک زمان و در یک بخش با بیوسنتز اسیدهای چرب انجام نمی‌شود. با انجام بیوسنتز اسیدهای چرب در سیتوپلاسم و اکسیداسیون آنها در میتوکندری‌ها، کنترل را می‌توان با تنظیم انتقال ترکیبات واسط مشترک در عرض غشاء میتوکندریایی انجام داد.

1. Feedback inhibition 2. Cross-regulation 3. Compartmentation

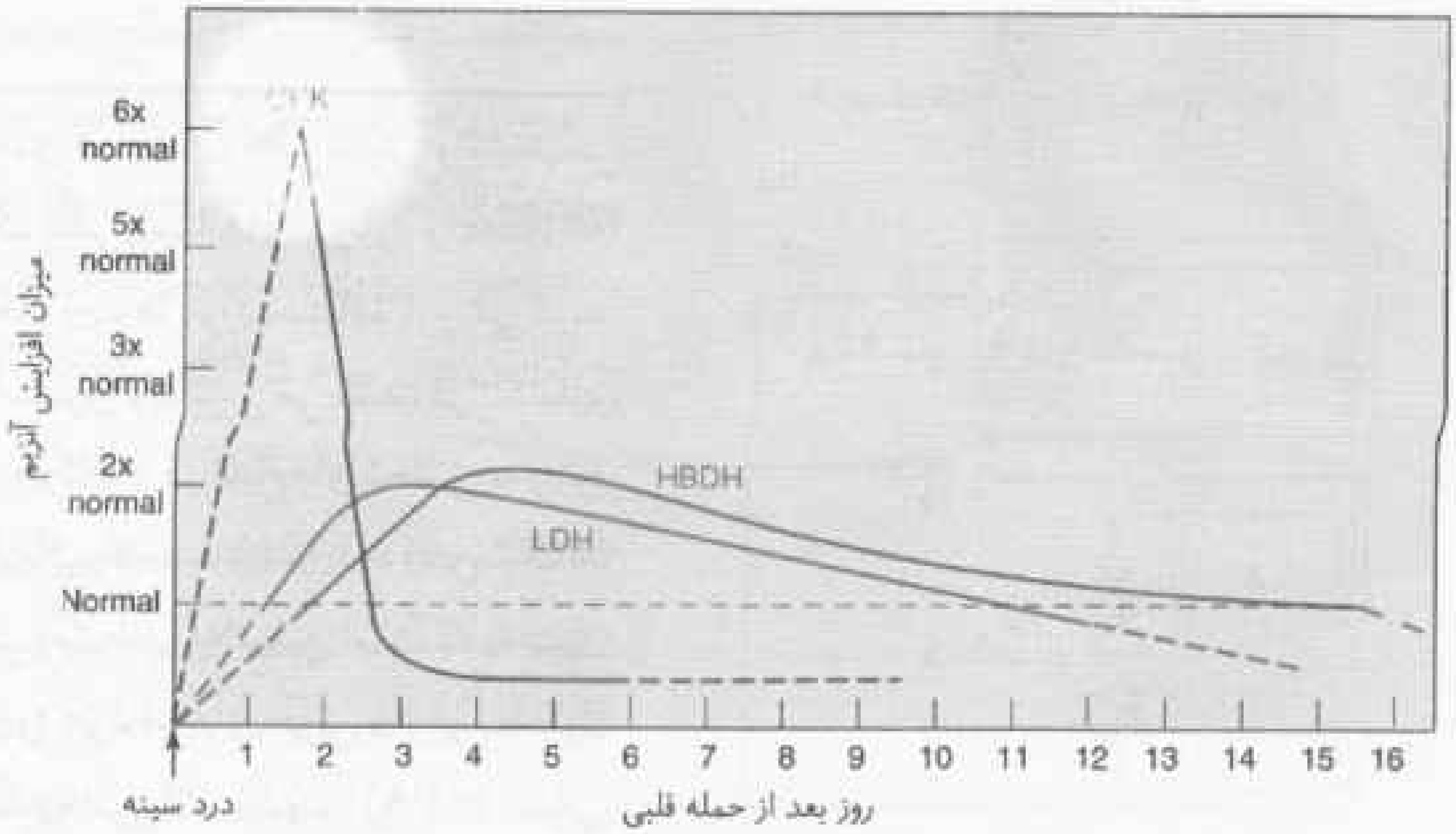
۱۲-۱۰ • کاربرد بالینی آنزیم‌ها

به دلیل خصوصیات متنوع، آنزیم‌ها کاربردهای زیادی در درمان، آنالیز بالینی و تشخیص بیماری‌ها دارند. برای مثال، آنزیم‌های هیدرولیتیک نظیر پروتئازهای پروناز [1] و RNaseها در برداشت مواد خارجی و بافت‌های مرده از محل زخم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. **استرپتوکیناز** که یک مخلـوط آنزیمی تهیه‌شده از استـرپتوکوکوس می‌باشد، در پاکسازی لخته‌های خونی مفید است که در هنگام آنفارکتوس میوکارد و در اندام‌های تحتانی به وجود می‌آیند. این آنزیم سبب فعال‌سازی پره‌آنزیم فیبرینولیتیک **پلاسمینوژن** می‌شود (ص ۱۳۲۲) که به‌طور طبیعی در داخل پلاسما وجود دارد. آنزیم فعال‌شده **پلاسمین** است که به‌عنوان یک سرین پروتئاز سبب تجزیه فیبرین نامحلول موجود در لخته‌های خونی به اجزاء محلول متعددی می‌شود. سرین پروتئاز دیگری به‌نام فعال‌کننده بافتی پلاسمینوژن [2] (t-PA) انسانی به شکل تجارتی توسط ***E.coli*** مهندسی‌شده تولید می‌گردد و برای انحلال لخته‌های خونی در مبتلایان به آنفارکتوس میوکارد مورد استفاده قرار می‌گیرد. **t-PA** نیز از طریق فعال‌سازی پلاسمینوژن عمل می‌کند.

اندازه‌گیری آنزیم‌های پلاسمایی

آنزیم‌های موجود در پلاسما دو نوع هستند: آنهایی‌که به‌طور طبیعی یافت می‌شوند و نقشی را در این محل دارند و آنهایی که از سلول‌ها آزاد می‌شوند. آنزیم‌های اخیر نقشی در پلاسما ندارند، ولی برای اهداف تشخیصی مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌طور طبیعی، محتوای پلاسمایی آنزیم‌های داخل‌سلولی پایین است و یا وجود ندارد، ولی با آسیب سلولی، محتویات آنها در داخل خون ظاهر می‌شوند. یک فرایند بیماری ممکن است سبب تغییراتی در نفوذپذیری غشاء شده یا مرگ سلولی را افزایش دهد، نتیجه آزادسازی آنزیم‌های داخل‌سلولی است. به‌علاوه در زمانی‌که افزایش غلظت داخل‌سلولی اجزاء دارای وزن ملکولی پایین وجود دارد، این ترکیبات می‌توانند به خارج سلول انتشار یابند. با آزمایش اجزاء سلولی در خون، پزشک می‌تواند به راحتی آسیب بافت‌های اختصاصی را مورد ارزیابی قرار دهد. برای تشخیص درگیری بافت‌های اختصاصی طی یک فرایند بیماری، حالت مطلوب این است که برای هر کدام از اعضاء مختلف بدن یک آنزیم بی‌همتا وجود داشته باشد و بتوان آن را در پلاسما اندازه‌گیری نمود. متأسفانه، آنزیم‌های یکسانی در اکثر بافت‌ها وجود دارند. هر چند در برخی موارد، ایزوزیم‌های مختلفی (ص.۵۱۲) در اعضاء مختلف وجود دارند؛ در صورت آزادسازی از بافت بیمار، اینها برای اهداف تشخیصی مفید خواهند بود. برای مثال، یک ایزوزیم الکل دهیدروژناز که برای کبد اختصاصی است و یک اسید فسفاتاز که اساساً در پروستات یافت می‌شود، برای تشخیص اختصاصی بیماری‌های مربوط به این اعضاء مفید هستند. در مورد برخی آنزیم‌ها، ایزوزیم‌های اختصاصی بافت، خصوصیات

1. Proteases pronase   2. Tissue plasminogen activator



شکل ۷۰-۱۰ کینتیک آزادسازی آنزیم‌های قلبی به داخل سرم بعد از یک آنفارکتوس میوکارد. *CPK*، کراتین کیناز؛ *LDL*، لاکتات دهیدروژناز؛ HBDH، α - هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز. براساس این نوع پروفایل‌های کینتیکی می‌توان تعیین نمود که بیمار نسبت به آنفارکتوس و بهبودی در چه وضعیتی قرار دارد. توجه CPK افزایش تیز و کم مدت دارد، HBDH آهسته افزایش می‌یابد ولی مدت بیشتری باقی می‌ماند.

کینتیکی متفاوتی دارند، لذا از تعیین مقدار K_m و k_{cat} آنها می‌توان برای تعیین بافت منشاء آنها استفاده نمود.

ارزیابی زمان ظهور و ناپدیدشدن آنزیم‌های خاص در پلاسما امکان تشخیص درگیری عضوی اختصاصی را فراهم می‌سازد. شکل ۷۰-۱۰ تغییرات وابسته به زمان فعالیت‌های پلاسمایی مربوط به آنزیم‌هایی را نشان می‌دهد که به‌دنبال حمله قلبی از میوکارد منشاء می‌گیرند. این نوع پروفایل‌ها به فرد این امکان را می‌دهند که مشخص کند در چه زمانی حمله رخ داده است و آیا درمان مؤثر بوده است یا خیر. ارتباط بالینی ۱۵-۱۰ نشان می‌دهد که تشخیص یک نقص آنزیمی اختصاصی منجر به درمان بالینی منطقی می‌شود و سبب بهبودی بیمار می‌گردد. مثال دیگر نحوه استفاده از ایزوزیم‌ها در تشخیص بیماری‌ها، الگوی ایزوزیمی برای لاکتات دهیدروژناز به‌عنوان تابعی از زمان بعد از یک آنفارکتوس قلبی می‌باشد (شکل ۷۱-۱۰ و جدول ۲-۱۰). نه تنها فعالیت آنزیمی کل افزایش می‌یابد، بلکه تغییری در الگوی ایزوزیمی وجود دارد که اساساً در میوکارد و گلبول‌های قرمز خون یافت می‌شود. در این مثال، LDH_5 افزایش می‌یابد که نشانه آسیب کبدی بیمار است. لذا عوارض ثانویه نارسایی قلبی را می‌توان زیر نظر گرفت. بعد از دو هفته، الگوی ایزوزیمی به حالت موجود در افراد طبیعی برمی‌گردد.

آنالیزهای کینتیکی هر دو آنزیم کراتین کیناز و لاکتات دهیدروژناز برای اهداف تشخیصی مفید هستند. نمودار ایزوزیم‌های CPK و LDH در شکل ۷۲-۱۰ به‌عنوان تابعی از زمان بعد از آسیب قلبی رسم شده است. ۱۸-۶ ساعت بعد از آنفارکتوس، آسیب بافتی سبب آزادسازی CPK_2 به داخل خون می‌شود، ولی آزادسازی LDH با ۲-۱ روز تأخیر بعد از ظهور CPK صورت می‌گیرد. به‌طور طبیعی، فعالیت ایزوزیم LDH_2 بیش از LDH_1 است؛ هر چند، در حالت آنفارکتوس میوکارد، در زمانی که میزان CPK_2 به میزان پایه برمی‌گردد (۶۰-۴۸ ساعت)، فعالیت LDH_1 بیش از LDH_2 می‌شود. تغییر ایزوزیم LDH همراه با افزایش

CPK_2 واقعاً در ۱۰۰٪ موارد برای آنفارکتوس میوکارد (MI) ارزش تشخیصی دارد. استفاده از آنزیم‌ها در آزمایشگاه بالینی در یک نگاه دقیق‌تر ۷-۱۰ و ۸-۱۰ شرح داده شده است.

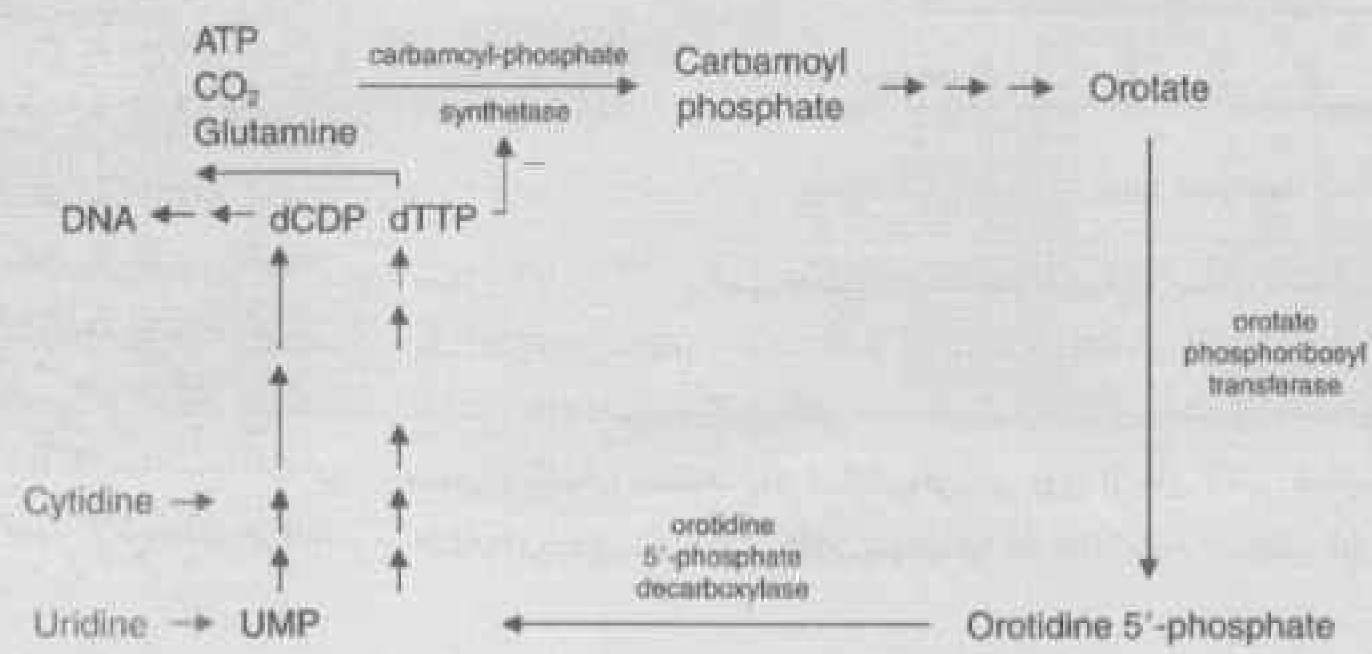
متابولومیک و پروتئومیک

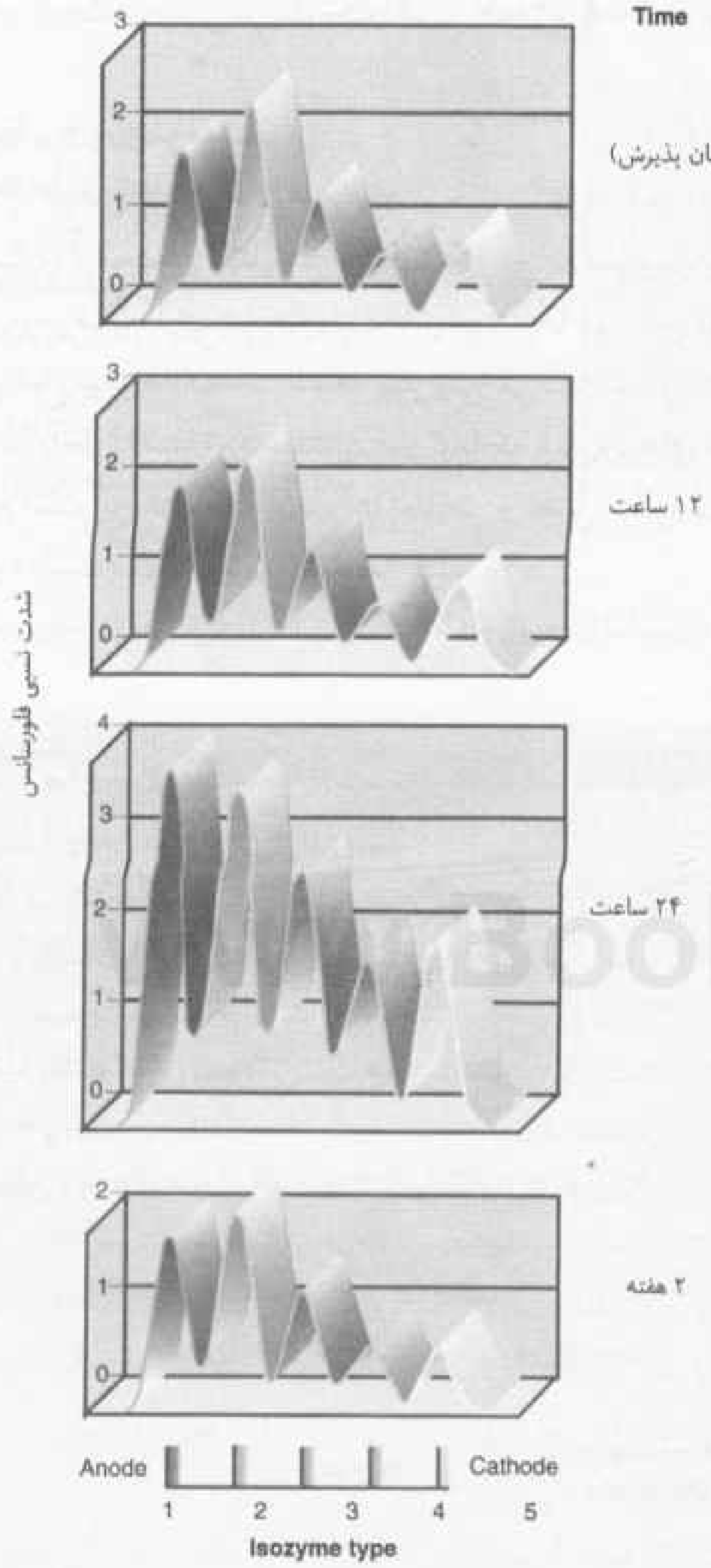
با استفاده از اسپکتروفتومتری‌های جرمی که در حال تبدیل به تجهیزات نسبتاً متداولی هستند، بسیاری از محققین امید یافتن متابولیت‌های اختصاصی، پروتئین‌ها، یا آنزیم‌های آزادشده از تومورها را دارند. این متابولیت‌ها و پروتئین‌ها می‌توانند به‌عنوان مارکرهای اختصاصی انواع تومورها انتخاب شوند. پیش‌بینی می‌شود که آنزیم‌ها و پروتئین‌های بی‌همتایی در داخل پلاسما مورد شناسایی قرار گیرند که با بیماری‌های مختلف در ارتباط هستند. لازم است این آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تخلیص و تعیین خصوصیت شوند تا اثرات آنها بر روی فعالیت سلولی طبیعی مشخص گردد.

ارتباط بالینی ۱۵-۱۰

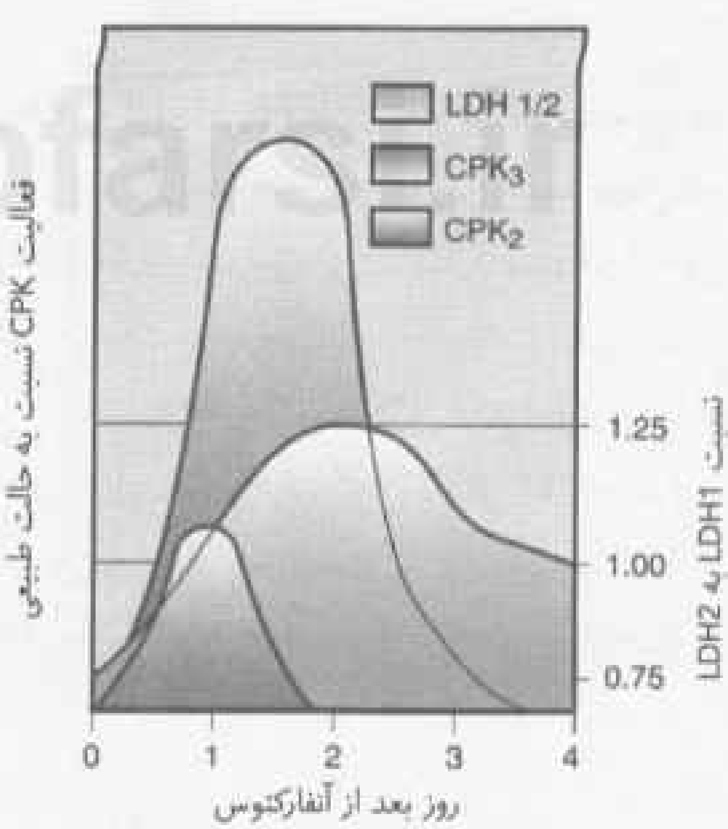
شناسایی و درمان یک کمبود آنزیمی

کمبودهای آنزیمی معمولاً منجر به افزایش تجمع متابولیت‌های واسط اختصاصی در پلاسما و بنابراین ادرار می‌شوند. شناسایی ترکیبات واسطی که در مایعات بیولوژیک تجمع می‌یابند، در نقص‌های آنزیمی احتمالی مفید می‌باشد. بعد از تعیین کمبود آنزیمی، متابولیت‌هایی که در مسیر ولی دور از محل توقف وجود دارند را ممکن است بتوان برای غلبه بر اثرات متابولیکی کمبود آنزیمی از خارج بدن تأمین نمود. در اوروتیک اسیدوری ارثی، یک کمبود آنزیم دوفعالیتی در مسیر بیوسنتتیک پیریمیدینی وجود دارد که منتهی به تجمع اسید اوروتیک می‌شود. نقص هم اوروتات فسفوریبوزیل ترانسفراز و هم اوروتیدین '5-فسفات دکربوکسیلاز وجود دارد که سبب کاهش مقادیر CTP و TTP در بدن می‌شود. کمبود این دو فعالیت به این دلیل وجود دارد که هر دوی آنها مربوط به دومن‌های مجزای یک پلی‌پپتید ۴۸۰ اسید آمینه‌ای دوکاره هستند. تجویز پیریمیدین‌های از دست رفته به‌صورت اوریدین یا سیتیدین سبب تسریع در رشد و بهبود وضع عمومی و همچنین کاهش دفع اسید اوروتیک می‌شود. مورد اخیر به این دلیل رخ می‌دهد که TTP و CTP حاصل از اوریدین و سیتیدین از طریق مهار پس‌نوردی سبب سرکوب کرباميل آسپارتات سنتتاز، مرحله متعهدکننده، و در نتیجه کاهش تولید اوروتات می‌شوند.





شکل ۷۱-۱۰ پیگیری اسکن‌های دانسیتومتری ایزوزیم‌های LDH در فواصل زمانی مشخص‌شده بعد از یک آنفارکتوس میوکارد. ظرف ۱۲ تا ۲۴ ساعت، LDH تام افزایش می‌یابد و LDH1 بیش از LDH2 می‌شود. افزایش LDH5برای درگیری ثانویه احتقانی کبد ارزش تشخیصی دارد. توجه داشته باشید که مقیاس‌های محور y یکسان نیستند. بعد از الکتروفورز بر روی ژل‌های آگارز، فعالیت LDH با اندازه‌گیری فلورسانس NADH تولیدی در واکنش کاتالیزشونده توسط LDH مورد سنجش قرار می‌گیرد.



شکل ۷۲-۱۰ تغییرات مشخص در مقادیر ایزوزیم‌های سرمی CPK و LDH به دنبال یک آنفاکتوس میوکارد. ایزوزیم CPK2 (MB) ظرف یک روز بعد از آنفارکتوس به میزان حداکثر افزایش می‌یابد. CPK3 حدوداً یک روز بعد از CPK2 افزایش می‌یابد. میزان LDH تام بسیار آهسته‌تر افزایش می‌یابد. افزایش LDH1 و LDH2 ظرف ۱۲ تا ۲۴ ساعت با افزایش CPK2 در تشخیص آنفارکتوس میوکارد همکاری می‌کند.

یک نگاه دقیق‌تر ۷-۱۰

آزمون‌های آزمایشگاه بالینی با استفاده از آنزیم‌ها

آنزیم‌های موجود در اعضاء معمولاً در داخل سرم وجود ندارند، مگر این که آسیبی به بافت وارد شود. لذا اندازه‌گیری میزان سرمی آنزیم‌ها می‌تواند برای یک وضعیت بیماری ارزش تشخیصی داشته باشد. آزمون‌های اندازه‌گیری آنزیم‌های پلاسمایی براساس کنترل سیستم آزمون، شامل درجه حرارت، pH و غلظت سوبستراها، کوسوبستراها و کوفاکتورها می‌باشند. K_m آنزیم مورد آزمایش می‌بایست مشخص باشد. به‌طور معمول، آزمون‌ها در شرایط V_{max} انجام می‌شوند. شرایط آزمون براساس خصوصیات آنزیم طبیعی مطلوب‌سازی می‌شود، لذا ممکن است به شکل صحیحی میزان یک واریانت آنزیمی را به دلیل تفاوت احتمالی در pH مطلوب یا K_m متفاوت برای سوبسترا و کوفاکتورها، نسبت به حالت طبیعی، اندازه‌گیری نکند. در برخی واکنش‌ها، محصولات یا سوبستراها نور را جذب می‌کنند؛ لذا تغییر در جذب نوری به عنوان تابعی از زمان اندازه‌گیری می‌شود.

سوبستراهای متعددی سنتز شده‌اند که ترکیبات کروموفوریک هستند (نور را جذب می‌کنند و یا نور فلورسنت را نشر می‌دهند). کوآنزیم‌های NAD(P) و FAD به راحتی اندازه‌گیری می‌شوند، زیرا اشکال احیاء‌شده آنها نور را در دامنه مرئی جذب می‌کنند. بسیاری از آنزیم‌ها که مستقیماً NAD(P) یا FAD را احیاء نمی‌کنند، تولید سوبستراهایی برای دهیدروژنازهای وابسته به NAD(P) یا FAD می‌کنند. با جفت‌نمودن این دو واکنش آنزیمی، فعالیت آنزیم مورد نظر را می‌توان اندازه‌گیری نمود.

آنزیم‌ها، به‌عنوان معرف، در اندازه‌گیری متابولیت‌ها در آنالیزورهای بالینی خودکار مورد استفاده قرار می‌گیرند. گلوکز اکسیداز که آنزیم اکسیدکننده گلوکز است، برای اندازه‌گیری غلظت گلوکز در مایعات بدن مورد استفاده قرار می‌گیرد. آزمون‌های کلسترول با استفاده از کلسترول اکسیداز و تری-آسیل‌گلیسرول‌ها با لیپاز انجام می‌شوند. این آزمایش‌ها را می‌توان ظرف چند دقیقه با استفاده از مقادیر کم پلاسما انجام داد. آنزیم‌ها را می‌توان در لایه‌های جامد با کوفاکتورها و معرف‌های نشانگر ثابت نمود که در هنگام احیاء به کروموفور تبدیل می‌شوند. در مورد کلسترول اکسیداز، پراکسید هیدروژن محصول واکنش پراکسیدازی است و پراکسید تولیدی به واسطه یک پراکسیداز، به‌عنوان آنزیم دوم، یک ماده بیرنگ را به یک محصول رنگی اکسیده می‌کند.

یک نگاه دقیق‌تر ۸-۱۰

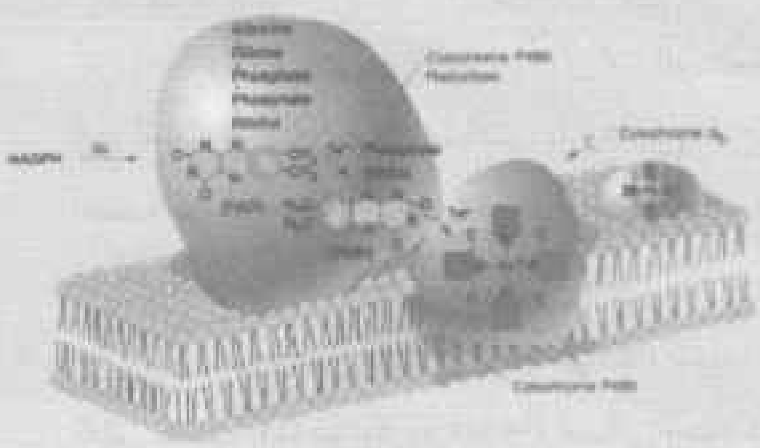
ایمونواسی‌های متصل به آنزیم با استفاده از آنزیم‌ها به‌عنوان نشانگر

شیمی بالینی امروزی از ترکیب شیمی آنزیم و ایمونولوژی بهره می‌برد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد یک آنتی‌ژن پروتئینی با یک آنزیم نشانگر نظیر پراکسیداز تربچه‌کوهی جفت‌شده تا یک آزمون بسیار اختصاصی و حساس را بوجود آورد. بعد از اتصال آنتی‌بادی جفت‌شده با پراکسیداز به آنتی‌ژن، این پراکسیداز برای تولید یک محصول رنگی مورد استفاده قرار می‌گیرد که قابل اندازه‌گیری است و غلظت آن با میزان آنتی‌ژن موجود در نمونه ارتباط دارد. نام این آزمون ELISA (آزمون جذب ایمنی متصل به آنزیم) می‌باشد. آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید آنتی‌بادی‌هایی می‌کنند که برای یک آنتی‌ژن بسیار اختصاصی هستند. به عنوان مثال، آنتی‌بادی‌های ضد یک ایزوزیم اختصاصی یا یکی از اعضاء آنزیم‌های بسیار مشابه تولید شده‌اند که امکان تعیین‌مقدار آنها به روش ELISA را فراهم می‌سازد.

پراکسیداز تربچه‌کوهی به عنوان یک نشانگر در ELISA جهت بررسی وجود آنتی‌ژن‌های پروتئینی پوشش ویروس نقص‌ایمنی انسانی (HIV) مورد استفاده قرار می‌گیرد. با گذشت زمان، پراکسیداز به ازاء هر آنتی‌ژن، تعداد زیادی ملکول محصول تولید می‌کند. این نوع آزمون‌های آنزیمی تقویت‌شده امکان اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم آنتی‌ژن‌ها را فراهم می‌سازند.



۱۱



سیتوکروم‌های P450 و اکسید نیتریک سنتازها

مفاهیم کلیدی

- سیتوکروم‌های P450 قرارگیری یک اتم اکسیژن در داخل سوبستراهای طبیعی و ترکیبات خارجی را کاتالیز می‌کنند. اینها حاوی هِم (پورفیرین IX آهن) هستند؛ آهن توسط الکترون‌های دریافتی از یک ردوکتاز حاوی FAD یا FMN احیاء می‌شود. طیف سیتوکروم‌ها از پنجمین لیگاند محوری آهن هِم متصل به یک ریشه سیستئین در هر پروتئین مشتق می‌شود.
- در اثر اکسیژناسیون استروئیدها تولید محصولات با ویژگی موقعیتی و

ویژگی فضایی می‌شود که برای تمایز جنسی (آندروژن‌ها و استروژن‌ها) و برای تعادل متابولیکی و الکترولیتی (گلوکوکورتیکوئیدها و مینرالوکورتیکوئیدها) لازم هستند.

- برخی سیتوکروم‌های P450 ویژگی سوبسترایی کمتری دارند و ترکیبات خارجی را برای دفع به محصولات قطبی‌تر متابولیزه می‌کنند. برخی از این محصولات سمی‌تر از سوبسترای ابتدایی هستند و با ادامه متابولیسم این اثرات از بین می‌روند. اکثر داروها توسط چندین سیتوکروم P450 اختصاصی موجود در شبکه آندوپلاسمی متابولیزه می‌شوند. گاهی تداخلات دارو - دارو رخ می‌دهد.
- برخی سیتوکروم‌های P450 می‌توانند القاء شوند، در حالی‌که بقیه فعالیت ثابتی دارند. ۵۷ سیتوکروم P450 انسانی وجود دارند؛ ۵۰ مورد در شبکه آندوپلاسمی قرار داشته و نیاز به NADPH-سیتوکروم ردوکتاز دارند.
- هیدروکسیلاسیون میتوکندریایی استروئیدها نیاز به الکترون‌هایی دارد که توسط NADPH و از طریق یک ردوکتاز حاوی FAD به یک پروتئین آهن - گوگرد، آدرنودوکسین و نهایتاً سیتوکروم P450 تأمین می‌شوند.
- در جمعیت‌های انسانی چندشکلی‌های ژنتیکی هم در سیتوکروم‌های P450 و هم در NADPH- سیتوکروم P450 ردوکتاز نشان داده شده است. جهش‌ها می‌توانند منجر به کاهش متابولیسم داروها و متابولیسم غیرطبیعی استروئیدهای جنسی شوند.
- اکسید نیتریک (NO) یک ملکول پیام‌رسان حاصل از منواکسیژناسیون می‌باشد که توسط اکسید نیتریک سنتازها (NOSs) کاتالیز می‌شود؛ این آنزیم‌ها حاوی FAD، FMN و هِم متصل به یک ملکول واحد می‌باشند که به صورت یک هُمودیمر کار می‌کنند. NO از گروه گوانیدینو موجود در L- آرژینین مشتق می‌شود و N- هیدروکسی- L- آرژینین یکی از ترکیبات واسط این واکنش است.
- NOSها متشکل از دو دومن مجزا، یکی حاوی FAD و FMN، و دیگری هِم می‌باشند که از طریق توالی اتصالی به کالمودولین به یکدیگر متصل می‌باشند. برای انتقال الکترون بین دومن‌ها نیاز به اتصال Ca^{+2} - کالمودولین می‌باشد. تتراهیدروبیوپترین و Zn نیز مورد نیاز هستند.
- NOSها توسط سه ژن تولیدکننده NOSI (NOS عصبی)، NOSII (NOS قابل القاء) و NOSIII (NOS آندوتلیال) کد می‌شوند. NOSI به‌طور ثابت اساساً در عضله اسکلتی و نورون‌های سیستم عصبی مرکزی و محیطی بیان می‌شود. این آنزیم با اتصال کالمودولین فعال می‌شود و NO تولیدی به عنوان یک نوروترانسمیتر و تعدیل‌کننده قابلیت انقباض عضلانی عمل می‌کند.
- NOSII اساساً در نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، آستروسیت‌ها و هپاتوسیت‌ها وجود دارد. این آنزیم توسط سیتوکین‌ها القاء می‌شود؛ کالمودولین تحت شرایط فیزیولوژیکی پایه اتصال می‌یابد. NOSII در ابتدای پاسخ ایمنی عمل می‌کند و تولیدکننده یک NO به‌عنوان یک عامل سیتوتوکسیک در برابر عوامل بیماریزا می‌باشد.
- NOSIII اساساً در سلول‌های آندوتلیال عروقی وجود دارد و از طریق ریشه‌های میریستیل و پالمیتیل به غشاء کاوئولی اتصال دارد. این آنزیم بیان ثابتی دارد و توسط Ca^{2+} فعال می‌شود. NOSIII تولید NO به عنوان یک متسع‌کننده عروقی می‌کند که با اثر بر روی گوانیلات سیکلاز در سلول‌های عضله صاف مجاور، نهایتاً منجر به اتساع عروقی می‌گردد.

۱-۱۱ • مقدمه

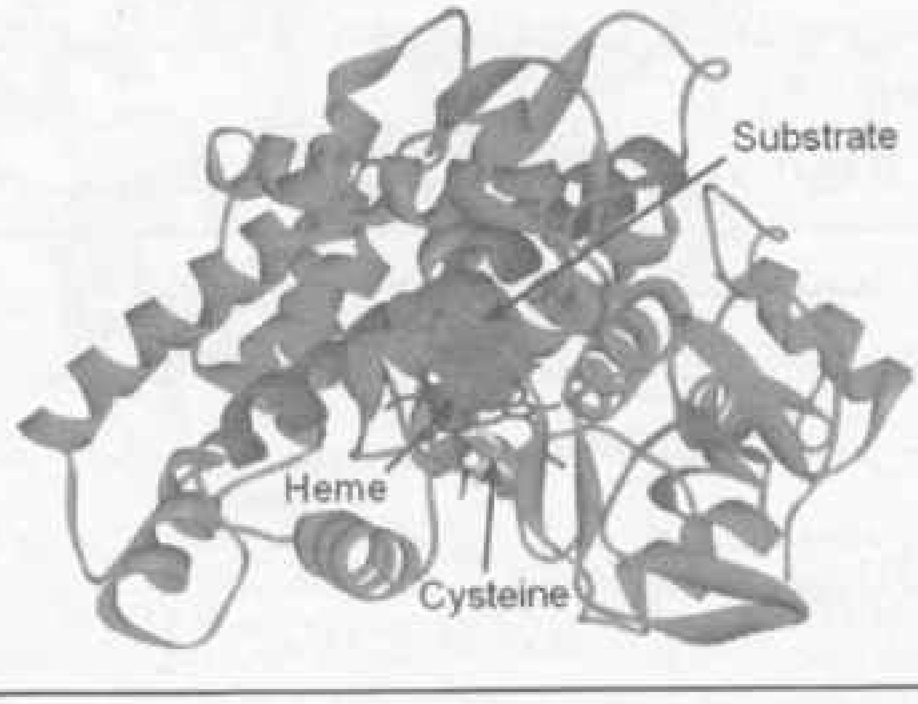
سیتوکروم‌های P450 یک خانواده بی‌همتا از پروتئین‌های هِمی هستند که در باکتری‌ها، قارچ‌ها، حشرات، گیاهان، ماهی‌ها، پستانداران و پرایمات‌ها وجود دارند و منواکسیژناسیون (یعنی قراردادن یک اتم از اکسیژن ملکولی) انواع مختلف و متعددی از ترکیبات دارای ساختمان متنوع را کاتالیز می‌کنند. سوبستراهای مربوط به این سیستم آنزیمی شامل هم ترکیبات با سنتز داخلی نظیر کلسترول، هورمون‌های استروئیدی، و اسیدهای چرب، و هم ترکیبات خارجی نظیر داروها، افزودنی‌های غذایی، ترکیبات حاصل از استعمال دخانیات، مواد ضدآفت، و مواد شیمیایی هستند که با خوردن، استنشاق یا از طریق پوست وارد بدن می‌شوند. سیتوکروم‌های P450 در فرایندهای مختلفی دخالت دارند: (۱) تولید هورمون‌های استروئیدی؛ (۲) متابولیسم اسیدهای چرب، پروستاگلاندین‌ها، لکوترین‌ها، و رتینوئیدها؛

(۳) غیرفعال‌سازی عوامل دارویی؛ (۴) تبدیل مواد شیمیایی به ملکول‌های شدیداً واکنشگر که ممکن است سبب آسیب سلولی ناخواسته شوند؛ و (۵) مهار یا القاء آنزیمی که منجر به تداخلات دارو- دارو و بروز عوارش جانبی می‌گردند.

اکسید نیتریک سنتازها آنزیم‌های دو دومنی متشکل از یک دومن حاوی هِم (یا اکسیژنازی) و یک دومن حاوی فلاوین (یا ردوکتازی) هستند. این آنزیم‌ها تولید اکسید نیتریک را کاتالیز می‌کنند که یک ملکول رادیکال آزاد گازی شدیداً واکنشگر است که برحسب بافتی که در آن تولید می‌شوند، در انتقال پیام عصبی، تنظیم همودینامیکی، یا در پاسخ ایمنی نقش دارند. همانند سیتوکروم P450، اکسید نیتریک سنتازها آنزیم‌های حاوی هِم هستند که منواکسیژناسیون سوبستراهای خود را با استفاده از مکانیسم‌های کاتالیتیکی مشابه کاتالیز می‌کنند. در ادامه به بحث پیرامون جزئیات سیتوکروم‌های P450 و اکسید نیتریک سنتازها می‌پردازیم و در این راستا به شباهت‌ها و تفاوت‌های این دو سیستم اشاره می‌شود.

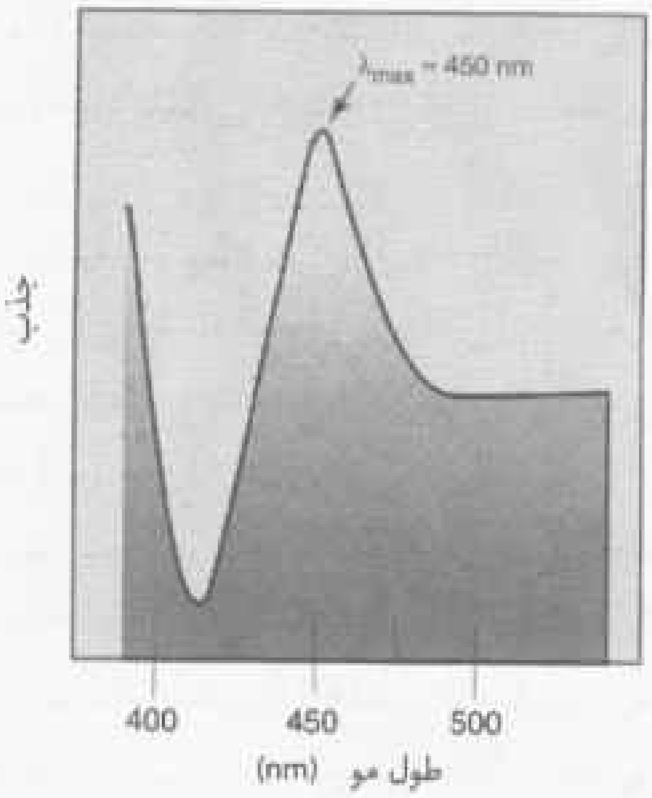
۱۱-۲ • سیتوکروم‌های P450: خصوصیات و عملکرد

سیتوکروم‌های P450 پروتئین‌های داخلی غشاء هستند که یک گروه پروستتیک پروتو- پورفیرین IX آهن (هِم) دارند (ص ۱۰۵۹). آهن هِم سیتوکروم‌های P450 قادر به ایجاد شش پیوند، چهار پیوند با چهار اتم نیتروژن پیرولی حلقه پورفیرینی و دو تا با لیگاندهای محوری، هستند. یکی از این لیگاندهای محوری (تحت عنوان نزدیک یا پروگزیمال) یک گروه سولفیدریل از یک ریشه سیستئین موجود در سمت انتهای کربوکسیل ملکول سیتوکروم P450 (شکل ۱-۱۱) است و دیگری (دور یا دیستال) جایگاه اتصال به لیگاند می‌باشد که می‌تواند آزاد بوده (تولید یک هِم پنج-کونوردینانسی، اسپین-زیاد[1]) و یا توسط اکسیژن، CO، NO، آب یا لیگاند دیگری اشغال شود (تولید یک هِم شش-کونوردینانسی، اسپین-کم[2]). وضعیت اسپینی هِم اشاره به اشغال لایه‌های d- الکترونی در داخل اتم



شکل ۱-۱۱ مدل جایگاه فعال CYP2C5 پستانداران که گروه پروستتیک IX (قرمز) را همراه با لیگاند تیولات (زرد) متصل به آهن هِم را نشان می‌دهد. سوبسترای دیکلوفناک، یک داروی ضدالتهاب غیراستروئیدی (سبز)، در جایگاه فعال P450. مارپیچ I (ارغوانی) بر روی ملکول پل می‌زند و یکی از خصوصیات ساختمانی سیتوکروم‌های P450 است که به راحتی قابل‌شناسایی می‌باشد.

1. Low-spin 2. High-spin



شکل ۲-۱۱ طیف جذبی سیتوکروم P450 متصل به منواکسید کربن. شکل احیاء شده سیتوکروم P450 به منواکسید کربن اتصال یافته تا حداکثر جذب را در حدود ۴۵۰ nm نشان دهد.

آهن دارد که براساس وضعیت اتصال لیگاند تعیین می‌شود؛ اینها را می‌توان به طریق اسپکتروسکوپی تمایز داد.

تمامی سیتوکروم‌های P450 ملکول‌های مثلثی شکلی هستند که شباهت زیادی با حالت نشان داده‌شده در شکل ۱-۱۱ دارد. نیمی از آنزیم حاوی ساختمان α است و نیمه دیگر شامل صفحه β و ساختمان‌های دیگر می‌باشد؛ یک مارپیچ بلند I سرتاسر آنزیم در پشت هِم را می‌پوشاند. این داربست پایه در میان تمامی سیتوکروم‌های P450 شناخته شده حفظ شده است، با این وجود ممکن است محل قرارگیری نسبی متفاوت باشد و برخی عناصر جزئی از دست رفته باشند. پروتئین‌های پستانداران دارای یک توالی لنگر غشایی انتهای آمینو و توالی‌های مرتبط با غشاء داخلی هستند که سبب می‌شود تا این پروتئین‌ها عمیقاً در داخل غشاء مدفون شوند.

علت نامگذاری سیتوکروم‌های P450 این است که طیف جذبی بی‌همتایی دارند که در زمان اتصال CO به شکل احیاءشده فرو هِم تولید می‌شود. این طیف یک قله را در حدود ۴۵۰ nm نشان می‌دهد (شکل ۲-۱۱)؛ لذا نام P450 برای رنگدانه‌ای انتخاب شد که در ۴۵۰ nm جذب دارد. این طیف مشخصه یک پروتئین هِمی با لیگاند تیولاتی است. همانند آهن هِم موجود در هموگلوبین، CO با تمایل بسیار بیشتری نسبت به اکسیژن به آهن هِمی سیتوکروم‌های P450 اتصال می‌یابد و به موجب آن یک مهارکننده قوی عملکرد آن می‌باشد.

واکنش عمومی که توسط سیتوکروم P450 کاتالیز می‌شود، به صورت زیر است

$$NADPH + H^+ + O_2 + SH \rightarrow NADP^+ + H_2O + SOH$$

که در آن NADPH یک دهنده دو-الکترونی است و سوبسترا (S) ممکن است یک استروئید، اسید چرب، دارو، یا ماده شیمیایی دیگری باشد که حاوی یک استخلاف آلکانی، آلکنی، حلقه آروماتیک یا حلقه هتروسیکلیک است که می‌تواند به‌عنوان محلی برای اکسیژناسیون عمل کند. واکنش یک منواکسیژناسیون و آنزیم یک منواکسیژناز است، زیرا تنها یکی از اتم‌های اکسیژن را در داخل سوبسترا قرار می‌دهد.

۳-۱۱ • سیستم‌های انتقال الکترون سیتوکروم P450

برای کل واکنش منواکسیژنازی نیاز به دو الکترون می‌باشد که توسط NADPH تأمین می‌شود، ولی از آنجایی که NADPH یک دهنده دو-الکترونی است (ص. ۷۶۰)، یک مشکل مکانیسمی پایه به وجود می‌آید. سیتوکروم P450 با یک آهن هِمی خود فقط می‌تواند یک الکترون را در هر زمان دریافت کند. این مشکل به‌واسطه وجود یک فلاووپروتئین ردوکتاز وابسته به NADPH حل می‌شود که هر دو الکترون NADPH را به‌طور همزمان دریافت می‌کند، ولی الکترون‌ها را به‌طور مجزا، یا از طریق یک پروتئین آهن-گوگرد واسط

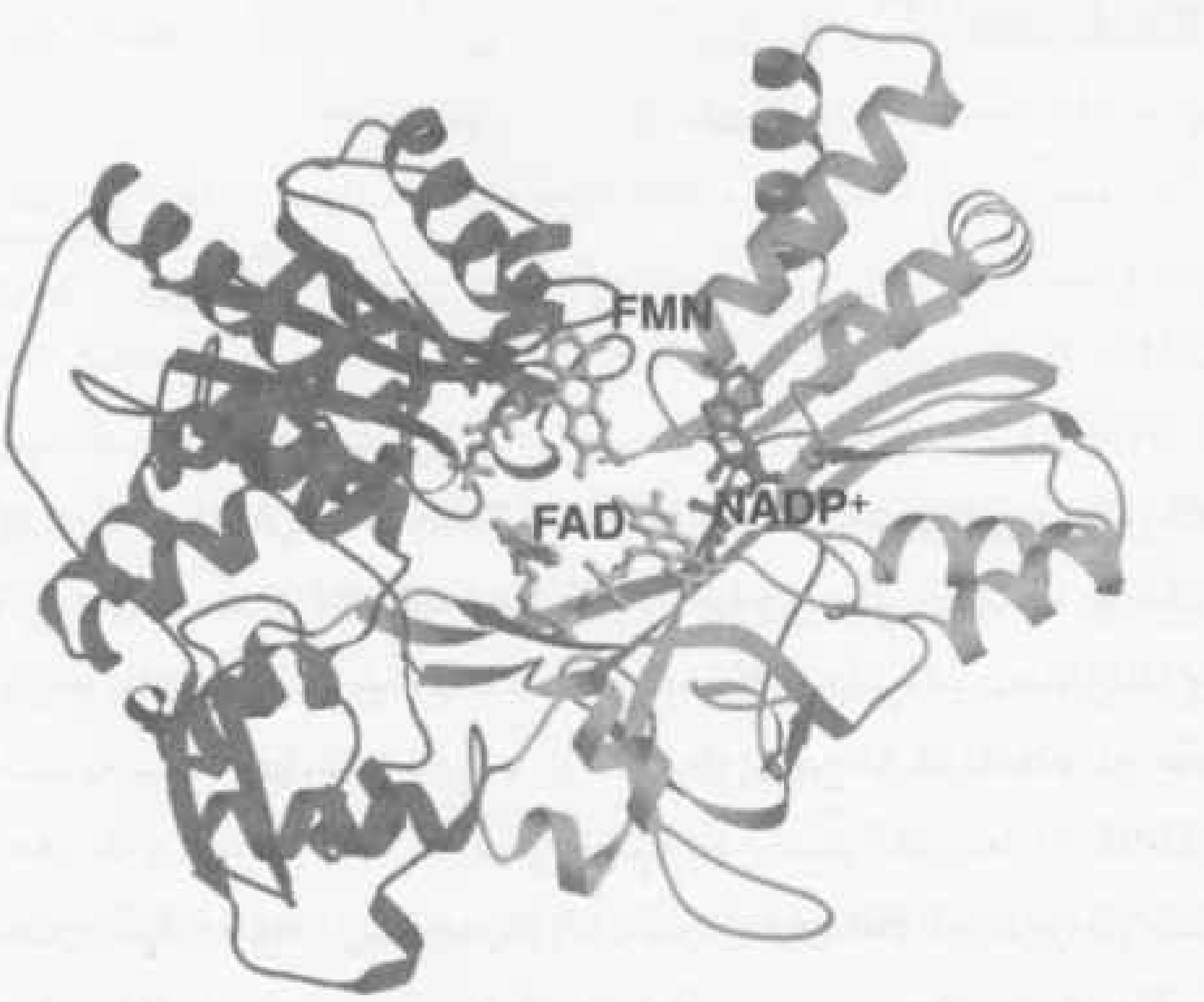
و یا به‌طور مستقیم، به سیتوکروم P450 انتقال می‌دهد. گروه ردوکس فعال فلاووپروتئین حلقه ایزوآلوکسازین آن است که به‌خوبی قابلیت انجام این وظیفه شیمیایی را دارد، زیرا می‌تواند به شکل کاملا اکسیده و یا در وضعیت‌های احیاءشده یک- و دو- الکترونی وجود داشته باشد (شکل ۳-۱۱). انتقال الکترون‌ها از NADPH به سیتوکروم‌های P450 توسط سیستم‌های انتقال الکترون متفاوتی انجام می‌شود که منحصراً در داخل میتوکندری یا شبکه آندوپلاسمی (میکروزوم‌ها) وجود دارند.



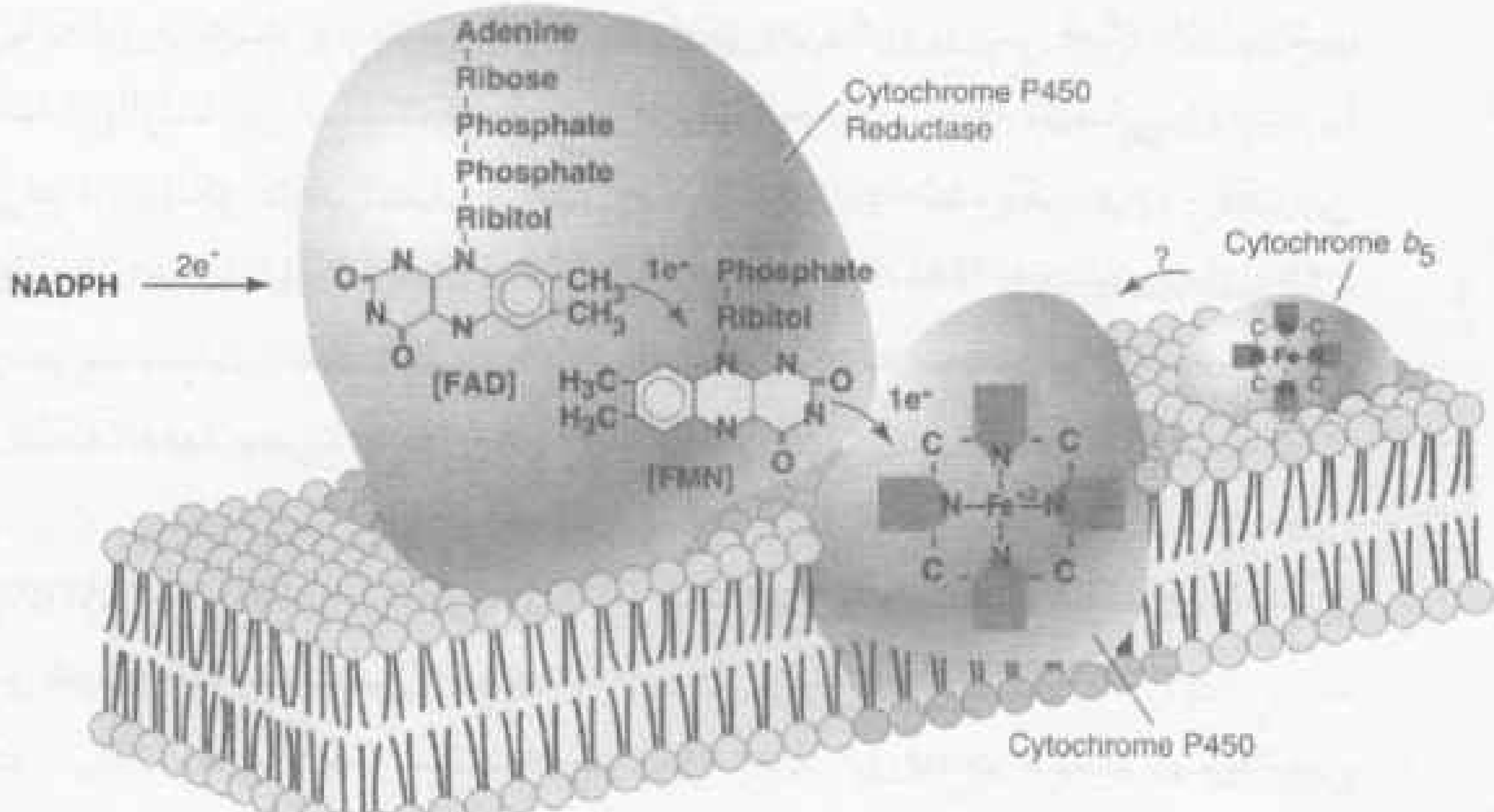
شکل ۳-۱۱ حلقه ایزوآلوکسازین FMN و FAD در حالات اکسیده، سمی‌کینونی (شکل احیاءشده تک‌الکترونی)، یا کاملاً احیاءشده (احیاء شده دوالکترونی) خود.

NADPH-سیتوکروم P450، ردوکتاز فلاووپروتئین دهنده الکترون اجباری در شبکه آندوپلاسمی است

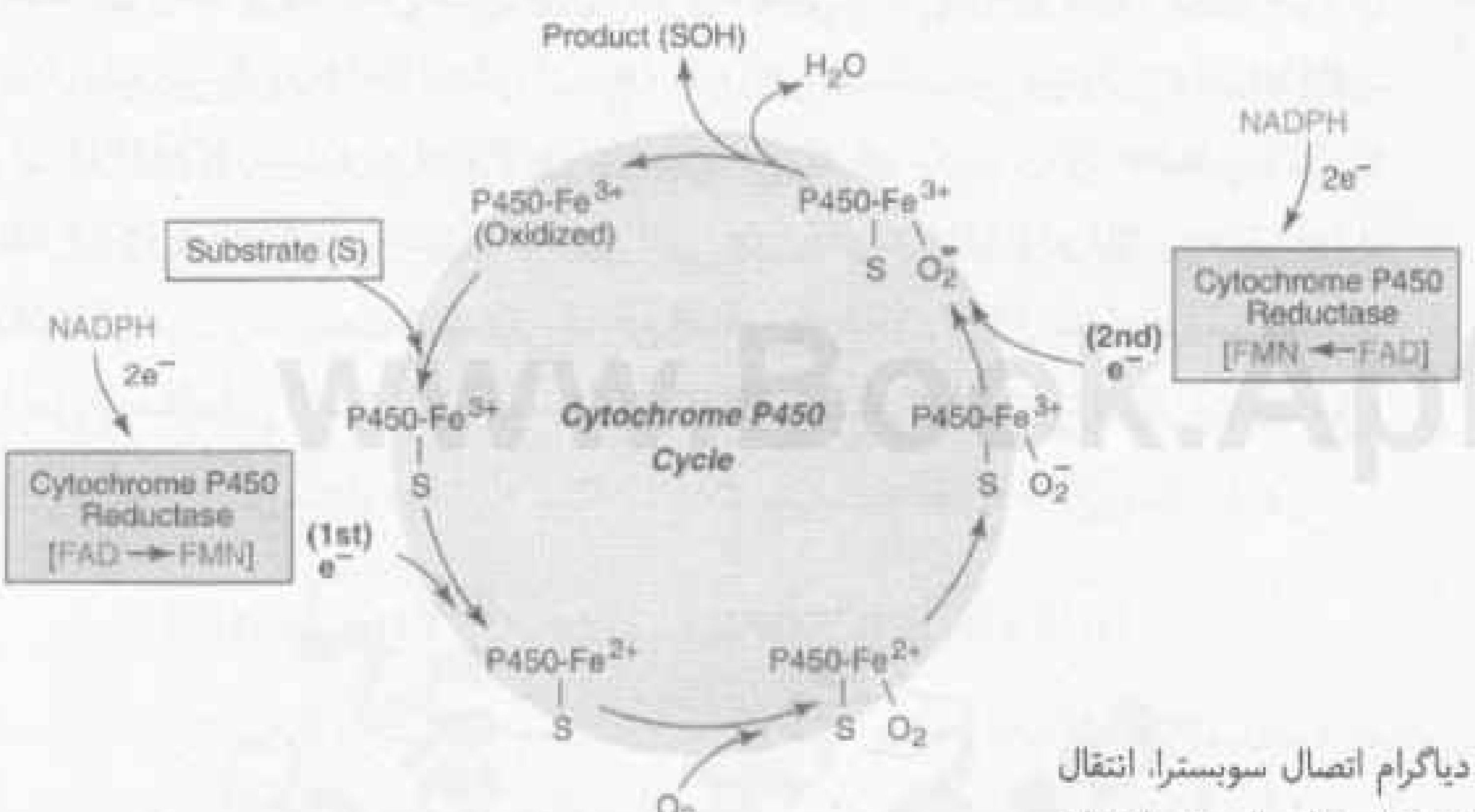
اکثر سیتوکروم‌های P450 پستانداران به شکل عمیقاً فرورفته در سمت سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی (فراکسیون میکروزومی) سلول‌های کبدی، کلیوی، کورتکس آدرنال، تخمدان، بیضه و همچنین سلول‌های مجرای تنفسی و غیره وجود دارند. پنجاه مورد از ۵۷ ایزوفرم سیتوکروم P450 انسانی از نوع میکروزومی هستند. این سیتوکروم‌های P450 از یک NADPH-سیتوکروم P450 ردوکتاز بهره می‌برند که یک پروتئین محیطی غشاء با ۷۶٫۶ kD و هر دو گروه پروستتیک فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید (FAD) و فلاوین منونوکلئوتید (FMN) است. ساختمان کریستالی ایزوفرم انسانی در شکل ۴-۱۱ نشان داده شده است. تا قبل از شناسایی اکسید نیتریک سنتازها، P450 ردوکتاز تنها فلاووپروتئین شناخته‌شده



شکل ۴-۱۱ دیاگرام نواری سیتوکروم P450 براساس ساختمان کریستالی آن. سه دومن وجود دارد: دومن اتصال به FMN (آبی)، دومن اتصال به FAD/NADPH (سبز)، و دومن مداخله‌گر متصل‌کننده (ارغوانی). کوفاکتورها با مدل‌های میله و کره نشان داده شده‌اند: آبی، FMN، زرد، FAD، و قرمز، $NADP^+$.



شکل ۵-۱۱ **اجزاء سیستم سیتوکروم P450 شبکه آندوپلاسمی (میکروزومی).** NADPH- سیتوکروم P450 ردوکتاز از طریق دم آبگریز خود به غشاء اتصال دارد (یک پروتئین محیطی)، در حالی که سیتوکروم P450 عمیقاً در داخل غشاء فرو رفته است (یک پروتئین داخلی). سیتوکروم b_5 نیز نشان داده شده است که ممکن است در واکنش‌های انتخابی بواسطه سیتوکروم P450 شرکت کند.



پتانسیل‌های ردوکس (mV) P450 از شبکه آندوپلاسمی

NADPH	-324
FAD	-290
FMN	-270
P450 heme	-300
P450 heme + substrate	-230

شکل ۶-۱۱ **چرخه واکنش سیتوکروم P450.** این دیاگرام اتصال سوبسترا، انتقال اولین و دومین الکترون از NADPH- سیتوکروم P450 ردوکتاز، و اتصال O_2 را نشان می‌دهد. پتانسیل احیاء اجزاء مختلف نیز نشان داده شده‌اند.

پستانداران بود که هم FAD و هم FMN داشت. NADPH الکترون‌ها را به بخش FAD از P450 ردوکتاز می‌دهد و FMN به عنوان فلاوین خروجی عمل می‌کند که دو الکترون را، یکی در هر زمان، به سیتوکروم P450 انتقال می‌دهد. از آنجایی‌که یک ملکول فلاوین ممکن است به شکل احیاءشده تک- یا دو- الکترونی وجود داشته باشد و دو ملکول فلاوین به هر ملکول ردوکتاز اتصال دارد، این آنزیم ممکن است الکترون‌ها را از NADPH دریافت کند و آنها را قبل از انتقال به یکی از سیتوکروم‌های P450 میکروزومی متعدد، بین دو ملکول فلاوینی ذخیره نماید (شکل ۵-۱۱).

مکانیسم کلی که توسط آن سیتوکروم‌های P450 منواکسیژناسیون سوبستراهای خود را کاتالیز می‌کنند، در شکل ۶-۱۱ نشان داده شده است. چرخه واکنش با اتصال سوبسترا

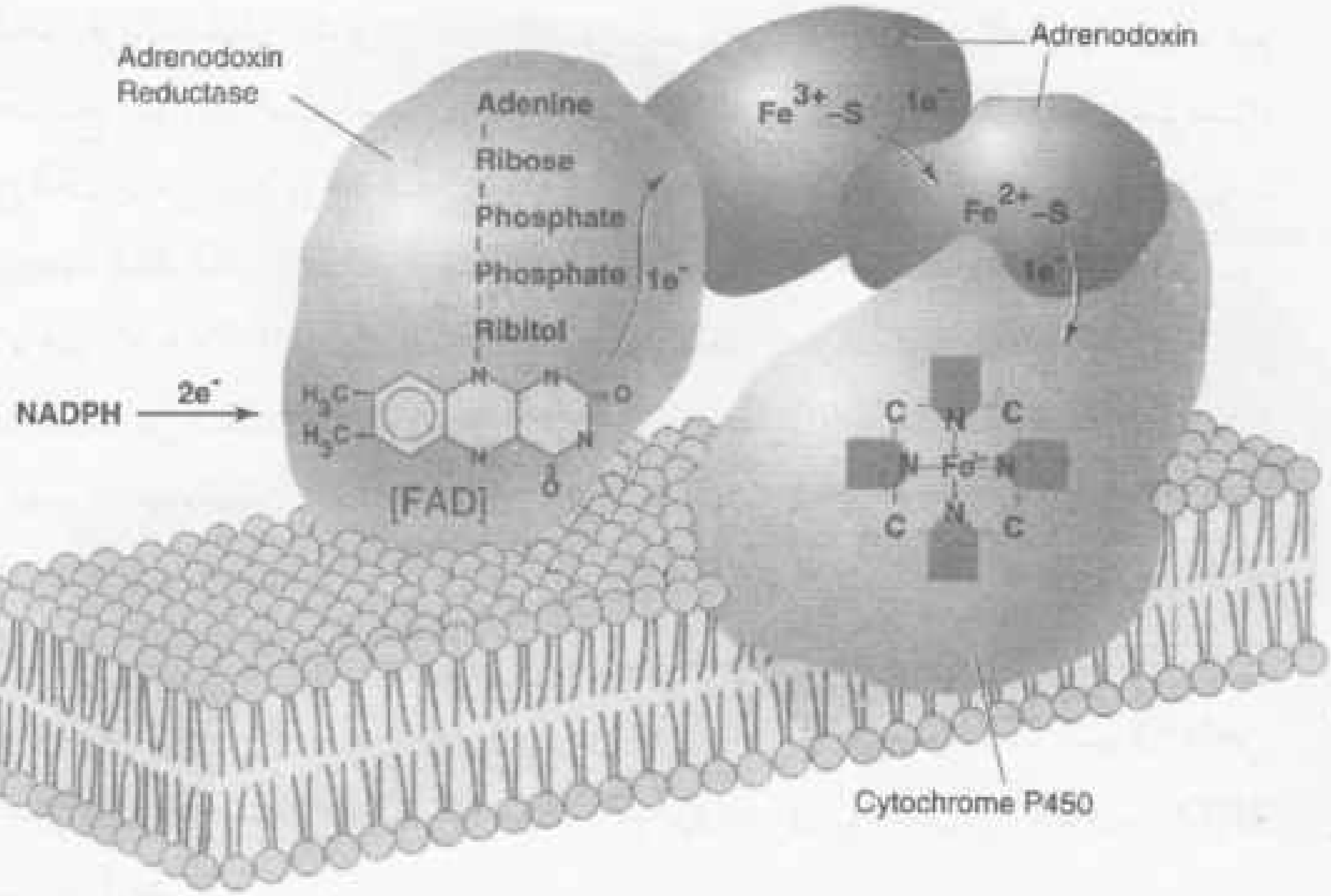
به شکل فریک، شش-کوئوردینانت، اسپین-کم بومی آغاز می‌شود که آن را به یک هِم فریک پنج-کوئوردینانت، اسپین-زیاد تبدیل می‌کند. بلافاصله بعد از اتصال سوبسترا، اولین الکترون می‌تواند به هِم انتقال یافته و آن را به شکل فرو پنج-کوئوردینانت، اسپین-زیاد احیاء کند. الکترون‌ها نمی‌توانند در غیاب سوبسترا به هِم انتقال یابند، زیرا پتانسیل احیاء هِم (V ۳۰۰-) در آن حالت بسیار الکترونگاتیوتر از بخش FMN (mV ۲۷۰-) می‌باشد که این انتقال را از نظر ترمودینامیکی نامساعد می‌کند. به دنبال اتصال سوبسترا، یک تغییر کونفورماسیونی در ساختمان پروتئینی احاطه‌کننده آهن هِم رخ می‌دهد و پتانسیل احیاء هِم مثبت‌تر (mV ۲۳۰-) می‌شود، لذا امکان احیاء آهن هِم P450 را فراهم می‌سازد (شکل ۶-۱۱). حالا اکسیژن می‌تواند به هِم فرو اتصال یافته و انتقال الکترون دوم تسهیل می‌شود. در ادامه اکسیژن ملکولی دوم فعال و شکسته می‌شود؛ یک اتم در داخل سوبسترا قرار داده شده (منواکسیژناسیون) و دیگری با دو پروتون و دو الکترون از H_2O ترکیب می‌گردد.

اتصال P450 و ردوکتاز به یکدیگر الکترواستاتیک و نه هیدروفوبیک است، و مقادیر P450 در کبد فراتر از ردوکتاز است و نسبت ۱۰ به ۱ تا ۲۰ به ۱ را دارد. در صورتی‌که یک P450-خاص تمایل بیشتری برای پیوستن به ردوکتاز داشته باشد، الکترون‌ها ترجیحاً به آن P450ها جریان خواهند یافت. لذا P450های دارای تمایل پایین می‌بایست مکانیسم‌هایی داشته باشند که به آنها امکان دریافت الکترون‌ها را بدهد. در برخی موارد، اتصال سوبسترا سبب افزایش تمایل و سرعت پیوستن کمپلکس P450/ردوکتاز می‌شود؛ این مکانیسم با معنی است، زیرا یک P450 «خالی» که ردوکتاز را به انحصار خود می‌آورد، همراه با تولید محصول نخواهد بود.

در بعضی موارد، انتقال الکترون دوم ممکن است مستقیماً از P450 ردوکتاز صورت نگرفته و ممکن است از طریق سیتوکروم b_5 انجام شود که یک پروتئین هِمی کوچک (۱۵/۲kDa) است و می‌تواند توسط P450 ردوکتاز یا هر فلاووپروتئین متصل به میکروزوم دیگر، NADPH-سیتوکروم b_5 ردوکتاز، احیاء شود. برخی واکنش‌هایی که توسط سیتوکروم‌های P450 کاتالیز می‌شوند، نیاز به سیتوکروم b_5 برای فعالیت آنزیمی مطلوب دارند که احتمالاً به این دلیل است که سیتوکروم b_5 (۱) تمایل تعامل P450/ردوکتاز را تغییر می‌دهد، (۲) تمایل P450 برای یک سوبسترای خاص را تغییر می‌دهد، یا (۳) سرعت انتقال الکترون دوم به هِم P450 را افزایش می‌دهد.

NADPH-آدرنودوکسین ردوکتاز فلاووپروتئین دهنده الکترون در میتوکندری است

سیتوکروم‌های میتوکندریایی P450 موجود در غشاء داخلی میتوکندری‌ها در واکنش‌های هیدروکسیلاسیون استروئیدی نقش دارند. هفت مورد از ۵۷ ایزوفرم انسانی از این نوع هستند.



شکل ۷-۱۱ اجزاء سیستم میتوکندریایی سیتوکروم P450. سیتوکروم P450 یک پروتئین داخلی میتوکندریایی است. NADPH-آدرنودوکسین ردوکتاز و آدرنودوکسین پروتئین‌های محیطی هستند که در داخل غشاء فرو نرفته‌اند.

این سیستم انتقال الکترون نیاز به دو پروتئین دیگر دارد: یکی NADPH-آدرنودوکسین ردوکتاز (۵۱ kDa) که یک گروه پروستتیک FAD واحد دارد و دیگری آدرنودوکسین که یک پروتئین آهن-گوگرد ۱۲/۵ kDa) برای تولید محصول می‌باشد (شکل ۷-۱۱). آدرنودوکسین ردوکتاز اتصال سُست به غشاء داخلی میتوکندری دارد و نمی‌تواند مستقیماً اولین یا دومین الکترون را به آهن هِمی سیتوکروم P450 انتقال دهد. پروتئین دوم، یعنی آدرنودوکسین، نیز که اتصال سُست به غشاء داخلی میتوکندری دارد، حاوی دسته آهن-گوگردی است که به‌عنوان یک مرکز ردوکس برای این ملکول عمل می‌کند و به‌عنوان یک شاتل الکترونی بین FAD آدرنودوکسین ردوکتاز و آهن هِمی یک سیتوکروم P450 میتوکندریایی فعالیت دارد. یک ملکول آدرنودوکسین یک الکترون از فلاووپروتئین ردوکتاز میتوکندریایی خود دریافت می‌کند و با یک آدرنودوکسین دوم در تعامل است که در ادامه الکترون خود را به یک سیتوکروم P450 اختصاصی انتقال می‌دهد. اجزاء سیستم سیتوکروم P450 میتوکندریایی در سیتوزول به‌صورت یک پیش‌ساز با وزن ملکولی بزرگتر سنتز می‌شود، به‌داخل میتوکندری‌ها انتقال داده می‌شود، و توسط پروتئازها به پروتئین‌های بالغ با وزن ملکولی کوچکتر پردازش می‌گردد.

۴-۱۱ • سیتوکروم‌های P450: نامگذاری و ایزوفرم‌ها

به‌دلیل تعداد زیاد سیتوکروم‌های P450 شناسایی شده (بیش از ۷۰۰۰ تا فوریه ۲۰۰۸)، لازم بود یک سیستم برای طبقه‌بندی این آنزیم‌ها به گروه‌های عملکردی و نامگذاری آنها ابداع شود. سیستم انتخابی متکی بر طبقه‌بندی براساس هویت نسبی توالی‌های اسید آمینه‌ای این آنزیم‌ها بود. لذا فوق خانواده سیتوکروم‌های P450 در ابتدا به دو خانواده

تقسیم شد که در آنها یکسانی[1] اعضاء بیش از ۴۰٪ است. خانواده با پیشوند «CYP» برای سیتوکروم P450 و به دنبال آن یک عدد عربی (برای مثال، CYP1، CYP2، CYP3، و غیره) مشخص می‌گردد. این خانواده‌ها به زیرخانواده‌هایی تقسیم می‌شوند که در آنها یکسانی توالی اسید آمینه‌ای اعضاء بیش از ۵۵٪ است. زیرخانواده با افزودن یک حرف بزرگ (برای مثال CYP1A، CYP1B، CYP1C، و غیره) شناسایی می‌شود. سپس هر کدام از اعضاء هر زیرخانواده براساس ترتیب شناسایی، شماره‌گذاری می‌شوند (برای مثال CYP1A1، CYP1A2، CYP1A3، و غیره). با وجود این که سیتوکروم‌های P450 آنزیم هستند، عموماً از واژه ایزوآنزیم یا ایزوزیم برای اشاره به این پروتئین‌ها استفاده نشده و به‌جای آن از واژه شکل یا ایزوفرم استفاده می‌گردد.

جداول ۱-۱۱ و ۲-۱۱ ایزفرم‌های P450 شناخته‌شده انسانی را فهرست کرده‌اند. ۵۷ ایزوفرم وجود دارند که به ۱۸ خانواده و ۴۱ زیرخانواده تقسیم می‌شوند. ژنوم انسان همچنین ژن‌های کاذب مربوط به ۵۸ CYP را کد می‌کند که تولیدکننده پروتئین فعال نیستند. جدول ۱-۱۱ ایزوفرم‌هایی را فهرست کرده است که اساساً بر روی ترکیبات خارجی، یعنی داروها و گزنوبیوتیک‌ها، اثر دارند؛ هر کدام از این ایز فرم‌ها انواع مختلفی از سوبستراها را متابولیزه می‌کنند. جدول ۲-۱۱ ایزوفرم‌های درگیر در متابولیسم ترکیبات داخلی را فهرست نموده است؛ این ایزوفرم‌ها تنها یک یا دو سوبسترای اختصاصی را شناسایی می‌کنند که در این جدول آورده شده‌اند.

۵-۱۱ • سیتوکروم P450: سوبستراها و فعالیت‌های بیولوژیکی

سیتوکروم‌های P450 انواع مختلفی از ترکیبات لیپیددوستی با منشاء داخلی و خارجی را متابولیزه می‌کنند. همان‌طورکه در شکل ۸-۱۱ نشان داده شده است، سیتوکروم‌های P450 ممکن است هیدروکسیلاسیون اتم کربن یک گروه متیل، کربن متیلن یا آلکان، هیدروکسیلاسیون یک حلقه آروماتیک در جهت تولید یک فنل، یا افزودن یک اتم اکسیژن به یک پیوند دوگانه در جهت تولید اپوکسید، را کاتالیز کنند. این آنزیم‌ها همچنین ممکن است واکنش‌های دآلکیلاسیونی را کاتالیز کنند که طی آنها گروه‌های آلکیل متصل به اکسیژن، نیتروژن یا سولفور برداشت می‌شوند. اکسیداسیون اتم‌های نیتروژن، سولفور، و فسفر و واکنش‌های دهالوژناسیون نیز توسط اشکال مختلف سیتوکروم‌های P450 کاتالیز می‌شوند.

هم سوبستراهای داخلی و هم سوبستراهای خارجی توسط سیتوکروم‌های P450 متابولیزه می‌شوند. سوبستراهای داخلی شامل کلسترول، استروئیدها، پروستاگلاندین‌ها، و اسیدهای چرب می‌باشند. در این موارد، واکنش‌ها ویژگی بیشتری از نظر ناحیه و فضا دارند و سیتوکروم‌های P450 تنها به سوبستراهای اختصاصی اتصال می‌یابند. سوبستراهای خارجی (گزنوبیوتیک‌ها، به معنی «خارجی نسبت به حیات») شامل داروها، مواد شیمیایی،

1. Identitiy

جدول ۱-۱۱ • سیتوکروم‌های P450 انسانی که در متابولیسم مواد خارجی نقش دارند

خانواده YP	ایزوفرم‌ها	سوبسترا (های) انتخابی	مهارکننده (های) انتخابی	القاءکننده(های) انتخابی
1	1A1	Benzo (a) pyrene, diclofenac	Ketoconazole	Benzo(a)pyrene
	1A2	Benzo(a)pyrene, warfarin	Ciprofloxin	St. John's wort
	1B1	Benzo (a) pyrene, aflatoxin B1	Tamoxifen	NC[a]
2	2A6	Acetaminophen, nicotine	Cannabidol	Dexamethazone
	2A7	NC	NC	NC
	2A13	Hexamethylphosphoramide	NC	NC
	2B6	Diazepam, mephenytoin	Ketoconazole	Rifampicin
	2C8	Taxol, ibuprofen, verapamil	Quinine	Phenobarbital
	2C9	Amitriptyline, naproxen	Sulfaphenazole	Rifampicin
	2C18	Imipramine, methadone	NC	Rifampicin
	2C19	Diazepam, omeprazole	Isoniazid	Rifampicin
	2D6	Fluvastatin, codeine, risperidone	Quinidine	Dimethylsulfoxide
	2El	Acetaminophen, halothane	Watercress	Isoniazid, ethanol
	2F1	Naphthalene, styrene	NC	NC
	2J2	Bufuralol	NC	NC
	2R1,2S1	NC	NC	NC
	2U1,2W1	NC	NC	NC
3	3A4	Erythromycin, nifedipine, Codeine, warearin	Troleandomycin, ketoconazole	Cortisol, rifampin, phenobarbital
	3A5	Verapamil, prevastatin	NC	Dexamethazone
	3A7	Retinoic acid, codeine, cortisol	DHEA	NC
	3A43	Testosterone	NC	NC

[a] NC، به‌خوبی مشخص نشده است.

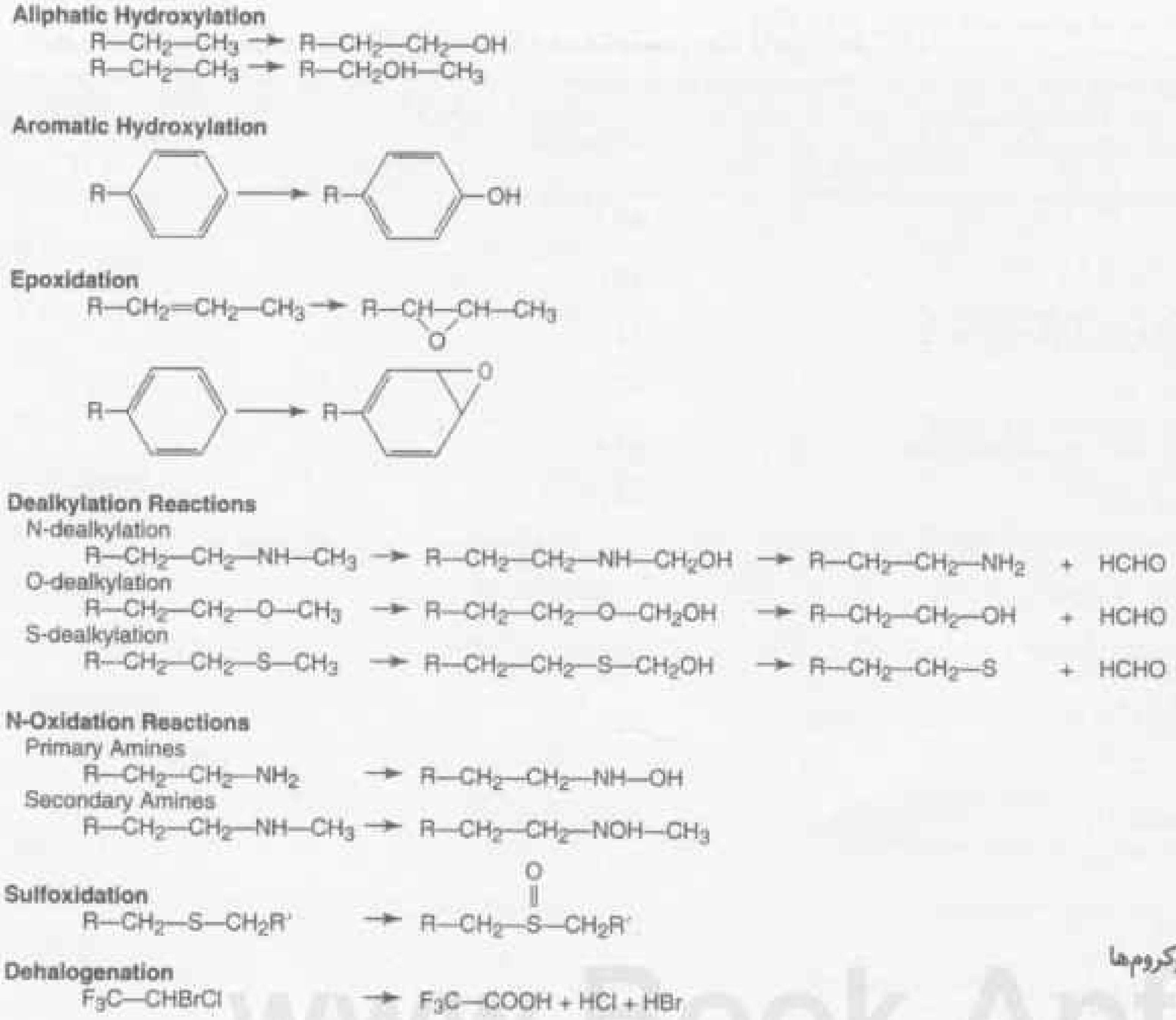
آلوده‌کننده‌های محیطی و افزودنی‌های غذایی می‌باشند. سیتوکروم‌های P450 این گروه تمایز کمتری را بین سوبستراها قائل می‌شوند و اساساً برای دفع این ترکیبات لیپیددوست (آبگریز) را به محصولات محلول‌تر در آب (آبدوست‌تر) تبدیل می‌کنند.

سیتوکروم‌ها در سنتز هورمون‌های استروئیدی و اکسیژناسیون ترکیبات داخلی شرکت می‌کنند

اهمیت واکنش‌های مربوط به سوبستراهای داخلی که توسط سیتوکروم‌های P450 کاتالیز می‌شوند، با سنتز هورمون‌های استروئیدی از کلسترول در کورتکس آدرنال و اعضاء جنسی شرح داده می‌شود. برای تبدیل کلسترول به آلدوسترون و کورتیزول در کورتکس آدرنال، به

جدول ۲-۱۱ • سیتوکروم‌های P450 انسانی که در متابولیسم مواد داخلی نقش دارند

خانواده CYP	ایزوفرم‌ها	سوبسترا (ها)	فعالیت
4	4A11	Fatty acids	ω-Hydroxylase
	4B1	Arachidonic acid	12- Hydroxylase
	4F2	Arachidonic acid, leukotriene B_4	ω-Hydroxylase
	4F3	Leukotriene B_4	ω-Hydroxylase
	4F8	Arachidonic acid, prostaglandins	18-Hydroxylase
	4F12	Arachidonic acid	ω-Hydroxylase
	4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4X1, 4Z1	Unknown	Unknown
5	5A1	Prostaglandin H_2	Thromboxin A_2 synthase
7	7A1	Cholesterol	7-α-Hydroxylase
	7B1	Pregnenolone, dehydroepiandrosterone (DHEA)	7-α-Hydroxylase
8	8A1	Prostaglandin H_2	Prostacyclin synthase
	8B1	Sterols	12-α-Hydroxylase
11	11A1	Cholesterol	Side-chain cleavage
	11B1	11-Deoxycortisol, 11-deoxycorticosterone	11-β-Hydroxylase
	11B2	Corticosterone	18-Hydroxylase
17	17A1	Pregnenolone, progesterone	17-α-Hydroxylase
		17-hydroxy pregnenolone, 17-hydroxy progesterone	17-20 Lyase
19	19A1	Androstenedione, testosterone	Aromatase
20	20A1	Unknown	Unknown
21	21A2	Progesterone, 17-hydroxy progesterone	21-Hydroxylase
24	24A1	25-Hydroxy vitamin D3	24-Hydroxylase
26	26A1	Retinoic acid	4-Hydroxylase
	26B1	Retinoic acid	Unknown
	26C1	Unknown	Unknown
27	27A1	Sterol	27-Hydroxylase
		Vitamin D3	25-Hydroxylase
	27B1	Vitamin D3	1-α-Hydroxylase
	27C1	Unknown	Unknown
39	39A1	24-Hydroxy cholesterol	7-Hydroxylase
46	46A1	Cholesterol	24-Hydroxylase
51	51A1	Lanosterol	14-α-Demethylase

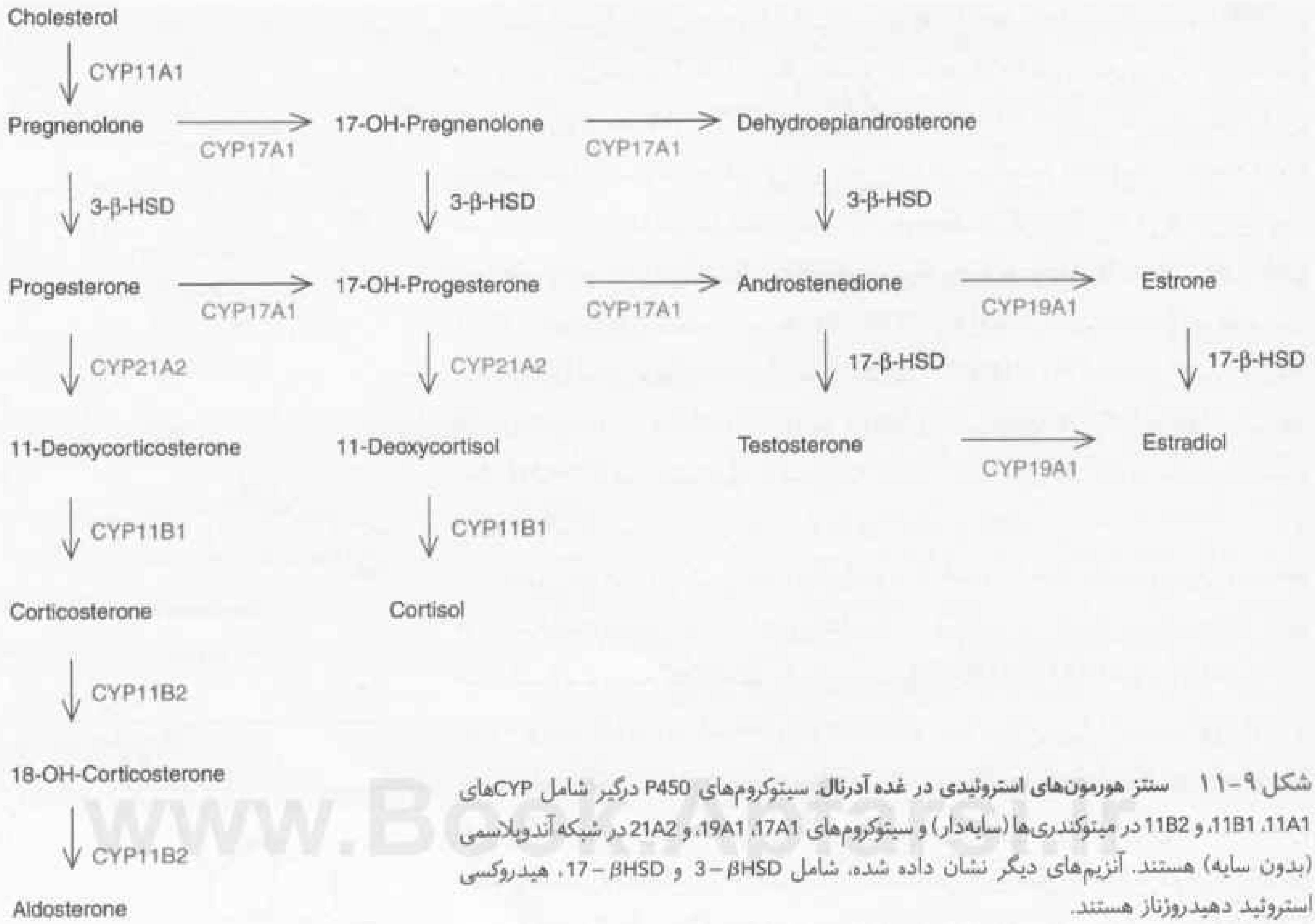


شکل ۸-۱۱ واکنش‌های معمولی که توسط سیتوکروم‌ها کاتالیز می‌شوند.

تستوسترون در بیضه‌ها و استرادیول در تخمدان‌ها، نیاز به هر دو سیستم سیتوکروم P450 میتوکندریایی و میکروزومی (شبکه آندوپلاسمی) می‌باشد.

سیتوکروم‌ها P450 مسئول انجام مراحل متعددی در سنتز آلدوسترون، مینرالوکورتیکوئید مسئول تنظیم تعادل آب و نمک، و کورتیزول، گلوکوکورتیکوئید مؤثر بر متابولیسم پروتئین، کربوهیدرات و لیپید، در آدرنال هستند. به‌علاوه، سیتوکروم‌های P450 سنتز مقادیر کم آندروژن آندروستن‌دیون را کاتالیز می‌کنند که یک تنظیم‌کننده خصوصیات جنسی ثانویه و پیش‌ساز هم استروژن‌ها و هم تستوسترون است. شکل ۹-۱۱ خلاصه‌ای از این مسیرها را نشان می‌دهد.

در میتوکندری‌های آدرنال، یک سیتوکروم P450 (CYP11A1) واکنش تجزیه زنجیر جانبی تبدیل‌کننده کلسترول به پرگننولون را کاتالیز می‌کند که یک مرحله متعهدکننده در مسیر بیوسنتز استروئیدها است. این واکنش مستلزم هیدروکسیلاسیون متوالی در اتم‌های کربن ۲۲ و ۲۰ در جهت تولید به ترتیب ۲۲-هیدروکسی‌کلسترول و سپس ۲۰،۲۲-دی‌هیدروکسی‌کلسترول می‌باشد (شکل ۱۰-۱۱). سپس CYP11A1 پیوند کربن-کربن را بین کربن‌های ۲۰ و ۲۲ شکسته تا تولید پرگننولون، یک استروئید ۲۱ کربنه، شود. برای این توالی واکنش‌ها نیاز به سه ملکول NADPH و سه ملکول O_2 می‌باشد که به‌طور کامل توسط CYP11A1 کاتالیز می‌شوند.

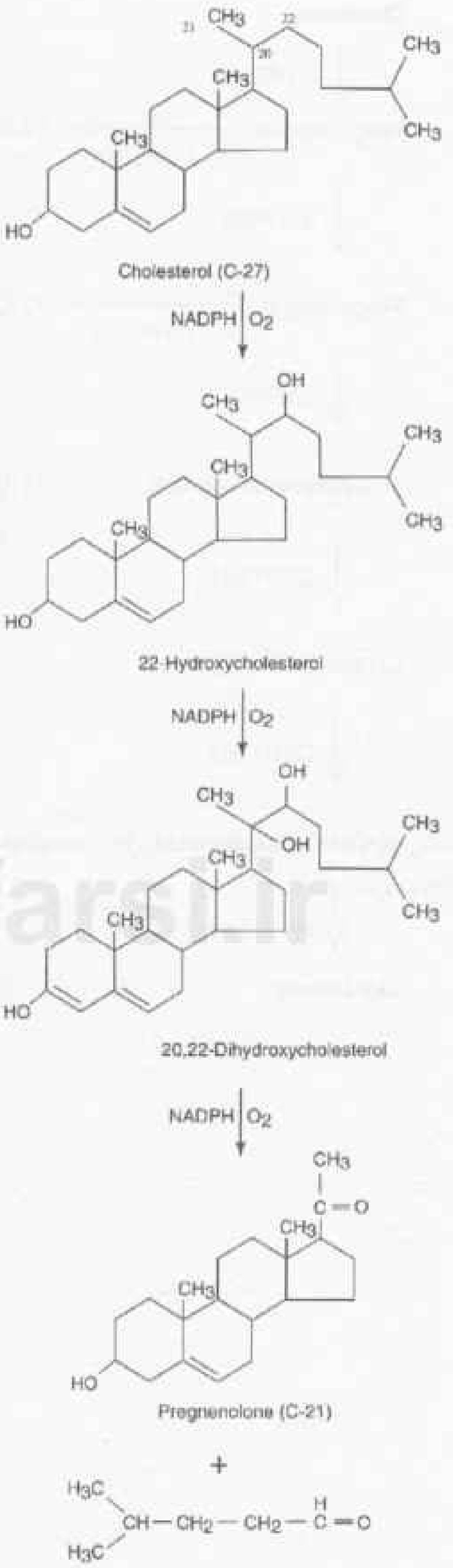


شکل ۹-۱۱ سنتز هورمون‌های استروئیدی در غده آدرنال. سیتوکروم‌های P450 درگیر شامل CYPهای 11A1، 11B1، و 11B2 در میتوکندری‌ها (سایه‌دار) و سیتوکروم‌های 17A1، 19A1، و 21A2 در شبکه آندوپلاسمی (بدون سایه) هستند. آنزیم‌های دیگر نشان داده شده، شامل $3-\beta HSD$ و $17-\beta HSD$، هیدروکسی استروئید دهیدروژناز هستند.

پرگننولون در میتوکندری تولید می‌شود، ولی به داخل سیتوزول می‌رود تا در آنجا توسط $3-\beta$-هیدروکسی استروئید دهیدروژناز $\Delta^{4,5}$-ایزومراز به پروژسترون تبدیل گردد. پروژسترون توسط P450 CYP21A2 میکروزومی در موقعیت کربن ۲۱ هسته استروئیدی هیدروکسیله شده و تولید داکسی‌کورتیکوسترون[1] (DOC) می‌کند. در ادامه DOC توسط CYP11B1 P450 میتوکندریایی در کربن ۱۱ هیدروکسیله و تولید کورتیکوسترون می‌کند که می‌تواند توسط آنزیم P450 میتوکندریایی دیگری، CYP11B2، در کربن ۱۸ هیدروکسیله و تولید مینرالوکورتیکوئید آلدوسترون کند (شکل ۹-۱۱).

کورتیزول از پرگننولون یا پروژسترون سنتز می‌شود و برای این منظور ابتدا توسط P450 CYP17A1 میکروزومی بر روی کربن ۱۷ هیدروکسیله می‌گردد. هیدروکسیلاسیون 17α-هیدروکسی‌پروژسترون در کربن ۲۱ توسط CYP21A2 هیدروکسیله شده و تولید ۱۱-داکسی‌کورتیزول می‌کند که خود به میتوکندری منتقل و در آنجا توسط CYP11B1 در کربن ۱۱ هیدروکسیله و به کورتیزول تبدیل می‌گردد (شکل ۹-۱۱). نقص‌های مادرزادی حاصل از جهش در ژن کدکننده CYP21A2 در ارتباط بالینی ۱-۱۱ مورد بحث قرار گرفته‌اند.

1. Deoxycorticosterone



شکل ۱۰-۱۱ واکنش تجزیه زنجیر جانبی کلسترول. هر سه واکنش متوالی توسط CYP11A1 کاتالیز می‌شوند تا تولید پرگننولون و ایزوکاپروئیک آلدئید شود.

سنتز استروئیدهای حاوی ۱۹ اتم کربن از 17α – هیدروکسی‌پرگننولون یا 17α – هیدروکسی پروژسترون با جداشدن گروه استیل از موقعیت ۱۷ صورت می‌پذیرد. این واکنش داستیلاسیون توسط CYP17A1 (از طریق یک واکنش ۲۰،۱۷ –لیاز) کاتالیز می‌شود. هنوز مشخص نشده است که چه عواملی تعیین می‌کنند این سیتوکروم P450 یک مرحله هیدرو- کسیلاسیون انجام دهد تا تولید محصول ۱۷– هیدروکسی گردد یا اینکه در ادامه پیوند بین کربن‌های ۱۷ و ۲۰ را بشکند، ولی به نظر می‌رسد که وجود سیتوکروم b_5 در بافت‌های گنادی امکان کاتالیز واکنش شکست توسط CYP17A1 را فراهم می‌سازد. محصولات حاصل از برداشت گروه استیل شامل دهیدرواپی‌آندروسترون (DHEA) از 17α – هیدروکسی پرگننولون یا آندروستن‌دیون از 17α– دهیدروکسی‌پروژسترون می‌باشند. DEHA ممکن است در محل OH–۳ به آندروستن‌دیون دهیدروژنه شود که یک استروئید آندروژنیک قوی است که به عنوان یک پیش‌ساز واسط تستوسترون عمل می‌کند.

استروژن‌ها طی واکنشی به‌نام آروماتیزاسیون که همراه با ایجاد حلقه آروماتیک در حلقه A محصول استروئیدی است، از آندروژن‌ها سنتز می‌شوند. در این واکنش پیچیده، واکنش‌های هیدروکسیلاسیون متعددی توسط یک آنزیم سیتوکروم P450، CYP19A1 یا آروماتاز، کاتالیز شده تا تولید حلقه آروماتیک به همراه برداشت گروه متیل در کربن ۱۹ شود. شکل ۱۱-۱۱، جزئیات این واکنش آروماتیزاسیون را نشان می‌دهد. دو واکنش هیدروکسیلاسیون متوالی در متیل ۱۹ منجر به ایجاد یک گروه آلدئیدی می‌شود. اولین مرحله ممکن است مستلزم حمله پراکسیدازی در کربن ۱۹ همراه با از دست‌رفتن گروه متیل و حذف اتم هیدروژن در جهت تولید حلقه آروماتیک باشد. هر سه واکنش هیدروکسیلاسیون توسط CYP19A1 کاتالیز می‌شوند. پیچیدگی تولید هورمون‌های استروئیدی در هنگام حاملگی و نقش اشکال P450 در ارتباط بالینی ۲-۱۱ شرح داده شده است.

سیتوکروم‌های P450 همچنین سایر ترکیبات داخلی را متابولیزه می‌کنند که در فرایندهای فیزیولوژیکی نقش دارند و بنابراین فعالیت آنها را تنظیم می‌کنند. برای مثال، اسید آراشیدونیک توسط سیتوکروم‌های P450 به اسیدهای ۱۹–و ۲۰–هیدروکسی ایکوزانوئیک (HETEs)، اسیدهای اپوکسی‌ایکوزاتتراانوئیک (EETs)، و اسیدهای دی‌هیدروکسی‌ایکوزاتتراانوئیک (DiHETEs) تبدیل می‌گردد. این متابولیت‌ها در تنظیم سیستم‌های عروقی، کلیوی، ریوی و قلبی و همچنین در پاسخ‌های التهابی و رشد فعالیت دارند. 20-HETE حاصل از متابولیسم اسید آراشیدونیک توسط CYP4As و CYP4Fs در انسان، یک منقبض‌کننده عروقی قوی است. EETs حاصل از CYP1A، 2B، 2C و 2J در انسان، متسع‌کننده‌های عروقی مشتق از آندوتلیوم هستند. CYP4As همچنین هیدروکسیلاسیون پروستاگلاندین‌ها و اسیدهای چرب و بنابراین فعال‌سازی و غیرفعال‌سازی این عوامل تنظیمی مهم را کاتالیز می‌کنند.

سیتوکروم‌های P450 همچنین متابولیت‌های حیاتی را برای حفظ هومئوستاز در

ارتباط بالینی ۱-۱۱

هیپرپلازی مادرزادی آدرنال: کمبود CYP21A2

کورتکس آدرنال که محل اصلی تولید هورمون‌های استروئیدی در دوران زندگی جنینی و بزرگسالی است، طی دوران جنینی فعالیت متابولیکی بیشتری دارد و ممکن است روزانه mg ۲۰۰-۱۰۰، در مقایسه با mg ۳۰-۲۰ در غده آدرنال یک فرد بالغ بدون استرس، هورمون استروئیدی تولید کند. کمبودهای آنزیمی در تمامی مراحل تولید کورتیزول گزارش شده است. بیماری‌های همراه با عدم کفایت در تولید کورتیزول را هیپرپلازی مادرزادی آدرنال[1] (CAH) گویند. معمول‌ترین کمبود آنزیمی در CAH مربوط به CYP21A2، یک ۲۱-هیدروکسیلاز، می‌باشد که منجر به اختلال در تبدیل 17α-هیدروکسی‌پروژسترون به ۱۱- داکسی‌کورتیزول می‌شود که خود توسط CYP11B1 به کورتیزول تبدیل می‌گردد. به‌دلیل کمبود کورتیزول، ترشح هورمون ACTH افزایش می‌یابد که هورمون هیپوفیزی تنظیم‌کننده کورتیزول است. مقادیر بالای ACTH به مدت طولانی سبب هیپرپلازی آدرنال و در نتیجه افزایش تولید هورمون‌های آندروژنیک دهیدرواپی آندروسترون (DHEA) و آندروستن‌دیون می‌گردد.

مشکلات بالینی به دلیل تولید مقادیر زیادی استروئیدهای آندروژنیک به‌وجود می‌آیند که نتیجه آن رشد نابه‌جای مو[2] در خانم‌ها و نمو زودرس دستگاه جنسی در پسرها قبل از بلوغ می‌باشد؛ برخی مشکلات نیز به دلیل بیماری‌های مرتبط با عدم تعادل نمک ناشی از کاهش میزان آلدوسترون می‌باشند. احتمال دارد عوارض بالینی کمبود شدید ۲۱- هیدروکسیلاز در زمان تولد، به‌خصوص در جنس مؤنث، قابل تشخیص باشد، زیرا تجمع هورمون‌های آندروژنیک ممکن است سبب نمو مبهم دستگاه تناسلی آنها شود. در نوزدان پسر، کمبود فعالیت ۲۱-هیدروکسیلاز ممکن است نمایان نباشد، زیرا دستگاه تناسلی ظاهر طبیعی دارد، ولی بعداً مردسازی و نمو فیزیکی زودرس رخ خواهد داد. در موارد CAH با شروع دیررس، علائم بالینی ممکن است شامل نمو زودرس موهای عانه، بسته‌شدن زودرس صفحات رشد اپی‌فیزی و در نتیجه توقف زودرس رشد یا الگوهای طاسی مردانه در زنان باشد.

1. Congenital adrenal hyperplasia
2. Virilization

ارتباط بالینی ۲-۱۱

تولید هورمون استروئیدی طی دوران بارداری

سیتوکروم P450 نقش اساسی را در سنتز استروژن بازی می‌کند. طی دوران بارداری، نیاز به یک تعامل بی‌همتا بین سیتوکروم‌های P450 موجود در اعضاء مختلف می‌باشد تا مقادیر زیاد هورمون مورد نیاز سنتز شود. تولید هورمون‌های استروئیدی به‌میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد و در انتهای دوره، به mg ۲۰-۱۵ استرادیول، mg ۱۰۰-۵۰ استریول و به‌خصوص mg ۲۵۰ پروژسترون در روز می‌رسد، میزانی که ۱۰۰۰ برابر بیش از میزان تولیدی در خانم‌های غیرباردار قبل از یائسگی است.

جسم زرد تخمدان محل اصلی تولید استروژن طی چند هفته ابتدایی بارداری است، ولی تقریباً در هفته چهارم بارداری، جفت شروع به سنتز و ترشح پروژسترون و استروژن‌ها می‌کند. بعد از هفته هشتم بارداری، جفت به منبع اصلی تولید پروژسترون تبدیل می‌شود. جفت انسان فاقد CYP17 است که واکنش 17α-هیدروکسیلاسیون و تجزیه پیوند بین کربن‌های ۱۷ و ۲۰ را کاتالیز می‌کند و بنابراین قادر به سنتز استروژن‌ها از کلسترول نیست. با این وجود جفت می‌تواند با کاتالیز واکنش تجزیه زنجیر جانبی، کلسترول را به پرگننولون تبدیل و سپس پرگننولون را به پروژسترون اکسیده کند که به داخل گردش خون مادر آزاد می‌شود. اگر جفت نمی‌تواند DHEA یا آندروستن‌دیون را از پروژسترون سنتز کند، پس چطور تولید استروژن می‌کند؟ غده آدرنال جنین که یک عضو استرئیدوژنیک شدیداً فعال است، DHEA را از کلسترول سنتز کرده و آن را وارد گردش خون جنینی می‌کند. میزان زیادی از DHEAجنینی توسط آدرنال و کبدجنینی به 16α-هیدروکسی DHEA تبدیل می‌شود که خود توسط CYP19 موجود در جفت به استروژن استریول تبدیل می‌گردد. این نمایشی از همکاری سیستم‌های هیدروکسیله‌کننده وابسته به سیتوکروم P450 در جنین و سیستم‌های عضوی مادر می‌باشد که منجر به تولید پیشرونده استروژن‌ها طی دوران نمو جنینی می‌شود.

سیستم‌های دیگر تولید می‌کنند. CYP7A1 اولین و مرحله محدودکننده - سرعت سنتز اسیدهای صفراوی در کبد را کاتالیز می‌کنند (ص.ص ۹۸۰ و ۱۳۹۷). در کبد، CYP27B1 واکنش ۱-هیدروکسیلاسیون ۲۵-هیدروکسی ویتامین D3 تولیدی در کلیه را به ۱، ۲۵-دی‌هیدروکسی ویتامین D3 کاتالیز می‌کند[1] که شکل فعال این هورمون است و در نمو و حفظ استخوان (ص ۱۴۱۷) مهم است، در صورتی‌که CYP24A1 در تجزیه یا غیرفعالسازی متابولیت‌های ویتامین D نقش دارد. در سیستم ایمنی، لکوترین B4 یک ماده شیمیایی جاذب لکوسیت چندهسته‌ای است که توسط CYP4F3 به ۲۰-هیدروکسی لکوترین B4 تبدیل می‌شود که فعالیت کمتری دارد و این واکنش برای غیرفعال‌سازی پاسخ ایمنی مهم است. اسید رتینوئیک توسط CYP26A1 به مشتق ۴-هیدروکسی متابولیزه می‌شود که فعالیت بیشتری نسبت به اسید رتینوئیک در برخی اعضاء دارد که در این محل‌ها نقشی را در چرخه سلولی و پیام‌رسانی بازی می‌کند. جدول ۲-۱۱ سیتوکروم‌های P450ای را فهرست نموده است که سوبستراهای داخلی را متابولیزه می‌کنند؛ در این جدول جزئیات مربوط به ویژگی‌های سوبسترایی و فعالیت‌های آنها نیز آورده شده است.

سیتوکروم‌های P450 سوبستراهای لیپیدوست خارجی را اکسیده می‌کنند

مواد خارجی که توسط سیتوکروم‌های P450 متابولیزه می‌شوند شامل داروهای درمانی، مواد شیمیایی مورد استفاده در محل کار، محصولات فرعی صنعتی که به آلوده‌کننده‌های محیطی تبدیل می‌شوند، و افزودنی‌های غذایی هستند سیتوکروم‌های P450 انسانی که در متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها نقش دارند در جدول ۱-۱۱ فهرست شده‌اند. این سیتوکروم‌های P450 که ویژگی‌های سوبسترایی وسیعی را نشان می‌دهند، دامنه وسیعی از گزنوبیوتیک‌ها، به‌خصوص ترکیبات لیپیددوست، را اکسیده می‌کنند. افزودن یک گروه هیدروکسیل به این ترکیبات سبب می‌شود تا به ترکیبات قطبی‌تر و بنابراین محلول‌تر در محیط آبی سلول تبدیل شوند. بسیاری از ترکیبات خارجی شدیداً لیپیددوست هستند و با گذشت زمان در داخل سلول تجمع پیدا خواهند نمود که پتانسیل تداخل با عملکرد سلولی را دارند مگر این که به محصولات آبدوست‌تر متابولیزه شوند.

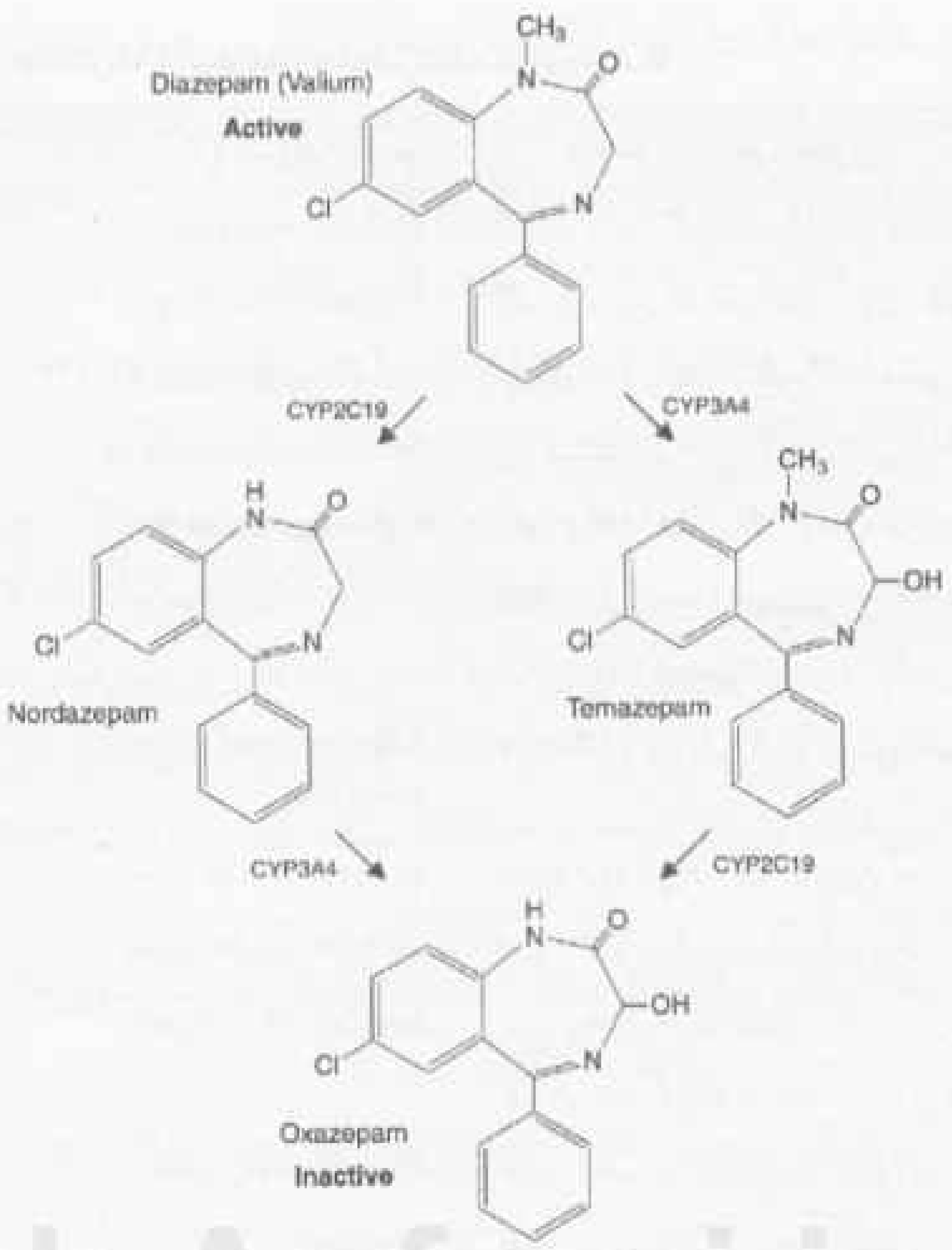
برآورد شده است که CYP3A4 حدود ۵۰٪ داروهای درمانی، CYP2D6 حدود ۲۰٪، CYP2C9 و 2C19 حدود ۱۵٪، و CYP1A2، CYP2A6، CYP2B6 و بقیه ۱۵٪ باقیمانده داروها را متابولیزه می‌کنند. CYP3A4 آنزیم P450 اصلی در متابولیسم داروها در انسان است. این آنزیم در مجرای گوارش و همچنین در کبد وجود دارد و مسئول فراهم-زیستی ضعیف بسیاری از داروهای خوراکی است. از آنجایی که سیتوکروم‌های P450 ویژگی‌های سوبسترایی ضعیفی دارند، یک ترکیب ممکن است توسط بیش از یک ایزوفرم



شکل ۱۱-۱۱ توالی واکنش‌های منتهی به آروماتیزاسیون آندروژن‌ها به استروژن‌ها.

---

۱. شکل صحیح این جمله به این صورت است: «در کلیه، CYP27B1 واکنش ۱-هیدروکسیلاسیون ۲۵-هیدروکسی ویتامین D3 تولیدی در کبد را به ۱، ۲۵-دی‌هیدروکسی ویتامین D3 کاتالیز می‌کند»، مترجم



شکل ۱۲-۱۱ متابولیسم دیازپام توسط CYP3A4 و CYP2C19. دیازپام ممکن است توسط بیش از یک P450 متابولیزه گردد. متابولیت‌های حاصل از یک ترکیب تحت تأثیر میزان اشکالی از P450 قرار می‌گیرد که در بافت‌ها بیان می‌شوند.

سیتوکروم P450 و یا در محل‌های مختلف متابولیزه شود؛ این موضوع در شکل ۱۲-۱۱ برای ترکیب دیازپام نشان داده شده است.

داروها و گزنوبیوتیک‌ها اساساً از طریق دو مسیر متابولیزه می‌شوند: فاز I (واکنش‌های اکسیداتیو عامل‌دارسازی[1]) و فاز II (واکنش‌های بیوسنتتیک). در متابولیسم فاز I توسط سیتوکروم‌های P450 (در کنار سایر آنزیم‌ها؛ جدول ۳-۱۱) یک گروه عامل نظیر گروه هیدروکسیل در داخل دارو قرار داده شده و یا بر روی آن عرضه می‌گردد. سپس در بسیاری از موارد، آنزیم‌های متابولیسم فاز II، این گروه عامل را به یک ترکیب داخلی نظیر اسید گلو - کورونیک، سولفات، گلوتاتیون، اسیدهای آمینه، یا استات متصل می‌کنند. اثر خالص یکی یا هر دوی این تغییرات این است که حلالیت ترکیب خارجی در آب بیشتر شده و بنابراین راحت‌تر، عموماً از طریق کلیه‌ها ولی همچنین از طریق روده‌ها بعد از ترشح به داخل صفرا، دفع گردد. سیتوکروم‌های P450 در فاز I، ولی نه در فاز II، متابولیسم نقش دارند. مثال‌های عمومی آنزیم‌های متابولیزه‌کننده گزنوبیوتیک‌ها و واکنش‌های مربوطه در جدول ۳-۱۱ نشان داده شده‌اند.

1. Oxidative functionalization reactions

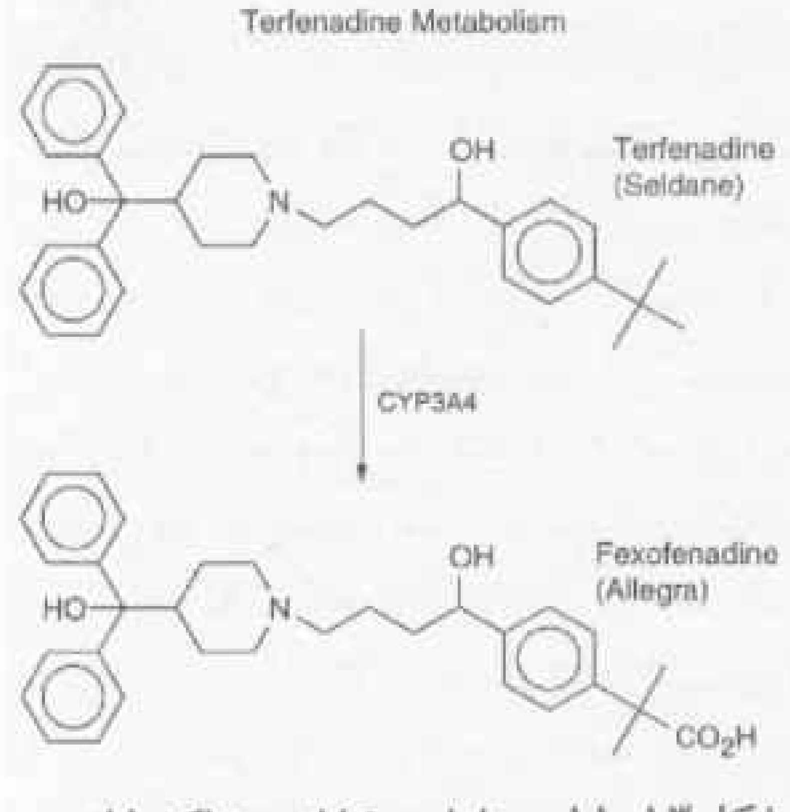
جدول ۳-۱۱ • واکنش‌ها و آنزیم‌های متابولیزکننده گزنوبیوتیک‌ها

نوع واکنش	نام عمومی آنزیم	واکنش آنزیمی عمومی
اکسیداسیون	Dehydrogenases	اکسیداسیون گروه‌های الکلی یا آلدئیدی
	Flavin-containing monooxygenases(FMO)	اکسیداسیون‌ها آمین‌های اول، دوم و سوم، نیترون‌ها، تیوالزها، تیوکرباکات‌ها، و فسفین‌ها
	Monoamine oxidases	برداشت یک آمین با دآمیناسیون اکسیداتیو
	Cytochrome P450	برای واکنش‌هایی که توسط آنزیم‌های P450 کاتالیز می‌شوند، جداول ۱-۱۱ و ۲-۱۱ و شکل ۷-۱۱ را ببینید
احیاء	Aldehyde and ketone reductases	احیاء گروه کربونیل به یک گروه هیدروکسیل
	Azoreductases	احیاء گروه آزو در جهت تولید آمین‌های اول
	Quinone reductases	احیاء کینون‌ها به هیدروکینون‌ها
هیدرولیز	Epoxide hydrolases	افزودن آب به آرن اکسید یا گروه‌های اپوکسید در جهت تولید گروه‌های هیدروکسیل مجاور
	Carboxylesterases	افزودن آب به یک پیوند استری
	Amidases	افزودن آب به یک پیوند آمیدی
کونژوگاسیون	*N*-acetyltransferases	افزودن کوآ از استیل کوآ به آمین‌های آروماتیک یا ترکیبات حاوی هیدرازین‌ها
	UDP-glucuronosyl transferases	افزودن اسید گلوکورونیک از اوریدین ′5- دی-فسفات (UDP)-گلوکورونیک اسید به گروه‌های کربوکسیل، فنلی، هیدروکسیل آلیفاتیک، آمین‌های آروماتیک یا آلیفاتیک، یا سولفیدریل
	Sulfotransferases	افزودن گروه سولفات از فسفوآدنوزیل فسفو سولفات به گروه‌های فنلی، الکل‌های آلیفاتیک یا آمین‌های آروماتیک
	Methyltransferases	افزودن گروه متیل از S- آدنوزیل متیونین به ترکیبات حاوی گروه‌های فنلی، کاتکولی، آمین‌های آلیفاتیک یا آروماتیک، یا سولفیدریل
	Glutathione S-transferase	کونژوگاسیون ترکیبات حاوی هترواتم‌های الکترو-فیلیک، یون‌های نیترنیوم، یون‌های کربانیوم، رادیکال‌های آزاد، گروه‌های اپوکسید، یا اکسید آرن

متابولیسم گزنوبیوتیک‌ها توسط سیتوکروم‌های P450 می‌تواند یکی از این سه اثر را بر روی ترکیب داشته باشند: **غیرفعال‌سازی**، **فعال‌سازی**، یا **تولید یک متابولیت سمی**. در

غیرفعال‌سازی، شکل فعال دارو به یک شکل غیرفعال تبدیل می‌شود و به همین دلیل فراهم زیستی آن کاهش می‌یابد و یا در مورد گزنوبیوتیک‌های مضر اثرات مضر بالقوه آن کاهش می‌یابد (برای مثال، فنوباربیتال). برای مثال، دیازپام (با نام برند والیوم، تجویز به‌عنوان یک مسکن) توسط CYP2C19 (*N*-دآلکیلاسیون) و 3A4 (هیدروکسیلاسیون) به اگزازپام فاقد فعالیت بیولوژیکی متابولیزه می‌شود (شکل ۱۲-۱۱) که سپس در فاز II قبل از دفع با اسید گلوکورونیک کونژوگه می‌شود.

داروهای دیگر تا زمان متابولیزه‌شدن توسط یک سیتوکروم P450 از نظر بیولوژیکی غیرفعال می‌باشند. داروی ترفنادین (با نام برند سِلدان، آنتاگونیست گیرنده H1 هیستامین که برای آلرژی‌های فصلی تجویز می‌شود) به شکل یک دارو یا پیش‌دارو غیرفعال است که با هیدروکسیلاسیون متوالی توسط CYP3A4 به فکسوفنادین فعال تبدیل می‌شود که شکل فعال موردنظر می‌باشد. (شکل ۱۳-۱۱). جزئیات مشکلات همراه با تداخلات فعال‌سازی ترفنادین در ارتباط بالینی ۳-۱۱ آورده شده است.



شکل ۱۳-۱۱   متابولیسم ترفنادین به فکسوفنادین، ترکیب فعال.

علاوه بر فعال‌سازی و غیرفعال‌سازی، متابولیسم از طریق سیتوکروم P450 می‌تواند به شکل ناآگاهانه‌ای منجر به تولید متابولیت‌های سمی شود. بنزو[a] پیرن یک ماده سرطانزای ضعیف است که در اثر سوختن ذغال، سوختن مواد موجود در تنباکو، غذاهای پخته‌شده بر روی ذغال، و پردازش صنعتی تولید می‌شود. این ترکیب توسط CYPهای 1A1، 1A2 و 1B1 به بنزو[a] پیرن-۸،۷-دی‌هیدرودیول-۹، ۱۰-اپوکسید تبدیل می‌گردد که یک ماده سرطانزای بسیار قویتر است (شکل ۱۴-۱۱). بنزو[a] پیرن توسط CYP1A1 به شکل ۷، ۸-اپوکسیدی تبدیل می‌شود. هیدرولیز بعدی توسط اپوکسید هیدرولاز همراه با تولید مشتق هیدروکسی، بنزو[a] پیرن-۸،۷-دی‌هیدرودیول، و یک واکنش اپوکسیداسیون توسط CYP1A1 یا 3A4 همراه با تولید بنزو[a] پیرن-۸،۷-دی‌هیدرودیول-۹، ۱۰-اپوکسید می‌باشد که می‌تواند اداکت‌های گوانینی در DNA ایجاد نموده و سبب اختلال در عملکرد ژن و نهایتاً جهش شود. تعامل بنزو[a] پیرن-۸،۷-دی‌هیدرودیول-۹، ۱۰-اپوکسید با ژن p53 یک مرحله بحرانی در مکانیسمی است که توسط آن بنزو[a] پیرن در انسان سرطانزا می‌شود. بنزو[a] پیرن همچنین به گیرنده آریل هیدروکربنی (AhR) اتصال یافته و سبب القاء این اشکال P450 و بنابراین افزایش متابولیسم خود می‌شود.

استامینوفن که معمولاً به‌عنوان یک داروی ضد درد و ضد تب مورد استفاده قرار می‌گیرد، توسط CYP2E1 به *N*-استیل-*p*-بنزوکینون ایمین (NAPQI) تبدیل می‌شود که یک ترکیب شدیداً واکنشگر است که منجر به تولید اداکت‌های پروتئینی، استرس اکسیداتیو، و سمّیت می‌شود. به‌طور طبیعی، استامینوفن اساساً طی مسیرهای گلوکورونیداسیون و سولفاسیون به کونژوگه‌های قطبی غیرفعالی تبدیل می‌شود که به‌راحتی دفع می‌گردند (شکل ۱۵-۱۱، به‌ترتیب مسیرهای بالا و پایین). استامینوفن توسط CYP2E1 به یک NAPQI شدیداً واکنشگر نیز تبدیل می‌شود (شکل ۱۵-۱۱، مسیر وسط). میزان استامینوفنی

ارتباط بالینی ۳-۱۱

مهار سیتوکروم P450: تداخلات دارو- دارو و عوارض جانبی

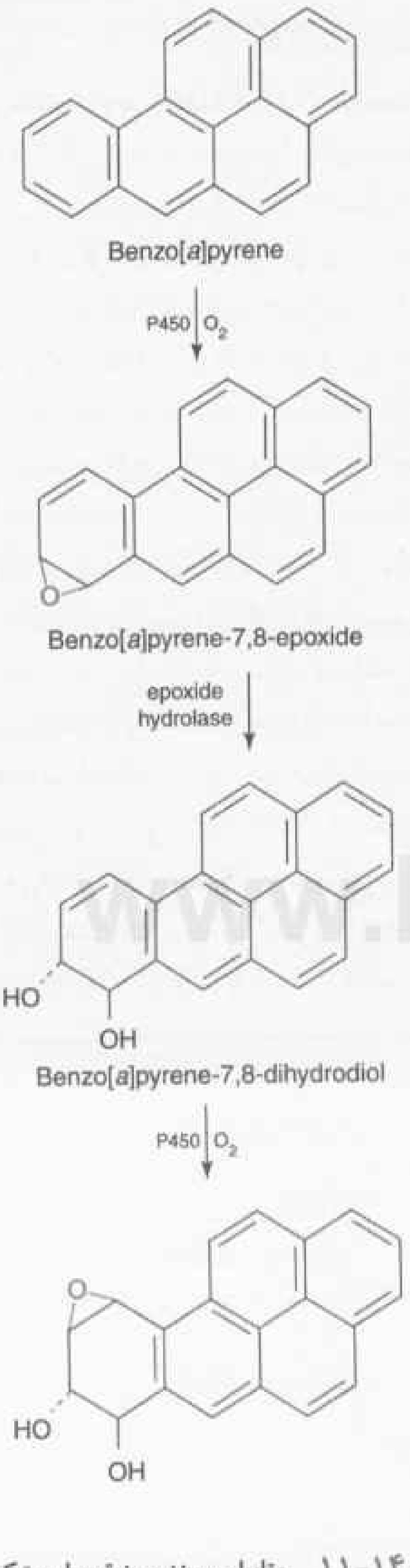
نقش‌هایی که سیتوکروم‌های P450 در متابولیسم دارو بازی می‌کنند و عواقب جدی تعاملات دارو- دارو به شکل واضحی توسط دو داروی ترفنادین (سِلدان)[1] و سیساپراید (پروپولسید)[2] در زمانی نشان داده می‌شود که متابولیسم آنها توسط داروهای دیگر مهار شود. درصد کوچکی از مصرف‌کننده‌ها دچار عوارض جانبی می‌شوند و همین موضوع باعث شد که تولیدکننده‌ها و اداره غذا و دارو (FDA) عنوان کنند که این داروها نباید با داروهای دیگری مصرف شوند که CYP3A4 را مهار می‌کنند. جدیت این عوارض جانبی سبب شد تا FDA هر دو دارو را از داروخانه‌ها جمع‌آوری کند.

FAD در سال ۱۹۸۵، ترفنادین را به‌عنوان آنتی‌هیستامین H1 نسل دوم برای درمان آلرژی‌های فصلی مورد تأیید قرار داد. همان‌طورکه در شکل ۱۳-۱۱ نشان داده شده است، ترفنادین سریعاً در کبد توسط CYP3A4 به فکسوفنادین متابولیزه می‌شود که نتیجه آن مقادیر کم داروی ابتدایی بلافاصله بعد از خوردن می‌باشد، ولی اثرات درمانی ترفنادین واقعاً تحت تأثیر فکسوفنادین قرار می‌گیرد. از آنجایی‌که بسیاری از داروهای دیگر، سوبسترا یا مهارکننده CYP3A4 هستند، متابولیسم ترفنادین قابلیت را مهار دارد. افرادی که ترفنادین را همراه با آنتی‌بیوتیک ماکرولیدی اریترو- مایسین یا عامل ضدقارچی کتوکونازول مصرف می‌کنند که هر دو مهارکننده CYP3A4 هستند، افزایش قابل‌توجه میزان پلاسمایی ترفنادین را خواهند داشت. در درصد کمی از این مصرف‌کننده‌های ترفنادین، مشکلات قلبی جدی به‌وجود می‌آید، زیرا داروی ابتدایی سبب ایجاد تغییراتی در کانال‌های پتاسیمی قلب شده و خطر نوعی تاکیکاردی بطنی نادر به‌نام Torsades de Pointes را افزایش می‌دهد. برخی افراد به‌دلیل مشکلات قلبی حاصل از مصرف همزمان ترفنادین با اریترومایسین یا کتوکونازول فوت کردند. از آنجایی‌که خصوصیات درمانی ترفنادین مربوط به متابولیت غیرسمی آن یعنی فکسوفنادین بود، تولیدکننده فکسوفنادین را به‌عنوان یک درمان مورد بررسی قرار داد و اقدام به دریافت تأییدیه FDA این متابولیت نمود که هم اکنون تحت عنوان آلگرا[3] عرضه شده است.

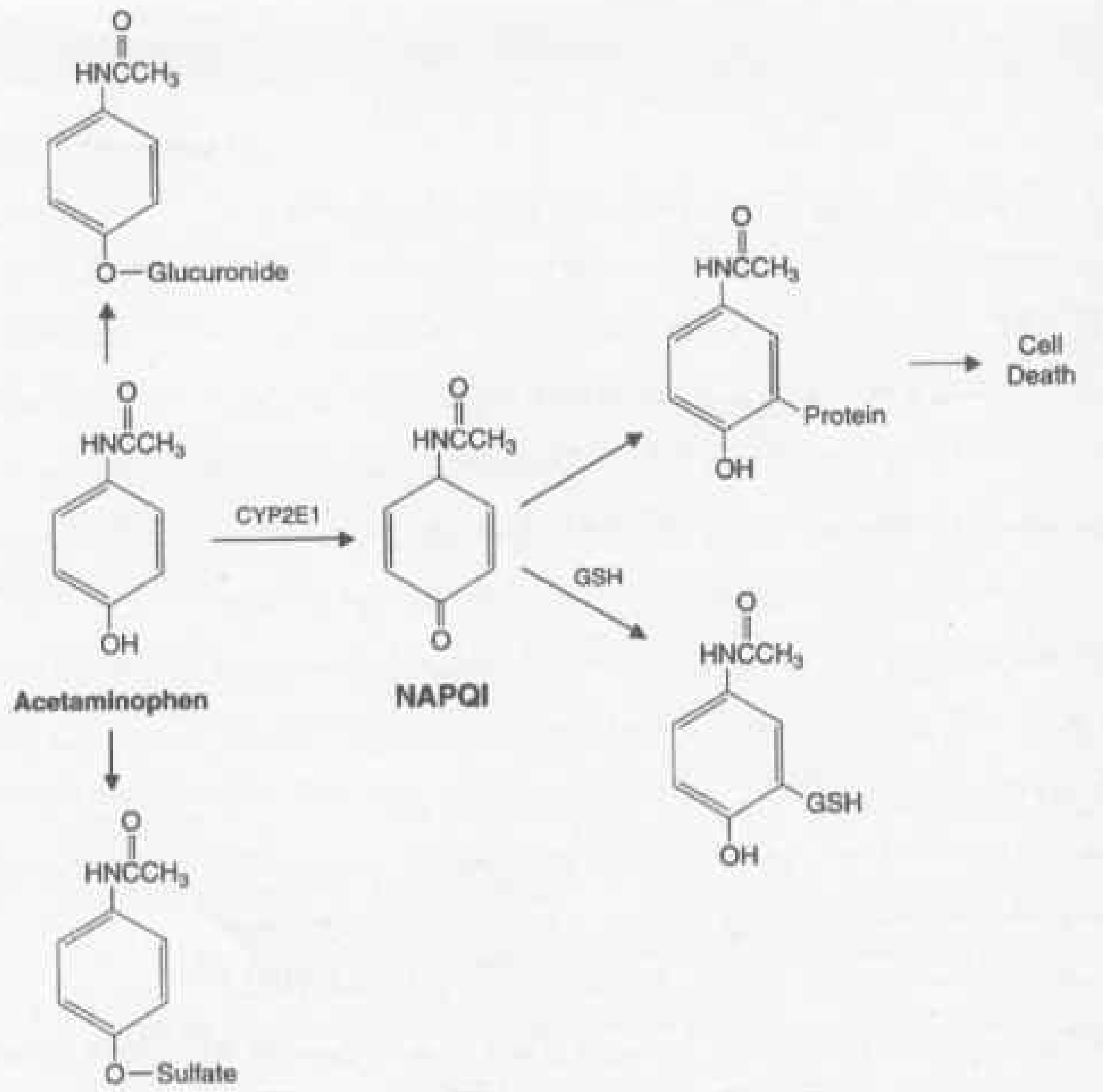
سیساپراید در سال ۱۹۹۳ برای بیمارانی مورد تأیید قرار گرفت که از سوزش سینه شبانه به دلیل بیماری رفلاکس معده‌ای-مری[4] (GERD) رنج می‌بردند. حذف این دارو از بدن وابسته به متابولیسم توسط CYP3A4 می‌باشد و وقتی به تنهایی یا با سایر داروهایی مصرف شود که CYP3A4 را مهار نمی‌کنند، داروی ابتدایی در پلاسما تجمع نمی‌یابد. هرچند، وقتی با داروهایی مصرف می‌شود که سوبسترا و یا مهارکننده CYP3A4 هستند، متابولیسم سیساپراید کاهش یافته و با مصرف این دارو تجمع می‌یابد. در برخی افراد، افزایش میزان سیساپراید منجر به آریتمی‌های قلبی می‌شود و تا آخر سال ۱۹۹۹، ناهنجاری‌های ریتم قلبی در ۳۴۱ بیماری گزارش شد که سیساپراید مصرف می‌کردند که منتهی به ۸۰ مرگ شد. برهمین اساس، تولیدکننده سیساپراید توزیع این دارو را بعد از سال ۲۰۰۰ در ایالات متحده متوقف نمود.

1. Terfenadine (Seldane)
2. Cisapride (Propulsid)
3. Allegra
4. Gastroesophageal reflux disease

که توسط CYP2E1 متابولیزه می‌شود، به‌طور طبیعی در مقایسه با متابولیسم از طریق گلوکورونیداسیون و سولفاسیون کم است. هر وقت مقادیر کم NAPQI تولید شد، سریعاً از طریق کونژوگاسیون با گلوتاتیون (ص ۱۰۵۷) به یک متابولیت غیرسمی تبدیل می‌شود. هرچند، وقتی میزان گلوتاتیون کاهش یابد، NAPQI متحمل واکنش کونژوگاسیون نشده و به دنبال تعامل با اجزاء سلول کبدی منجر به آسیب سلولی می‌شود. به‌طور طبیعی، مقادیر CYP2E1 در مقایسه با سایر اشکال P450 کم است و میزان تولید NAPQI با مصرف دوزهای طبیعی استامینوفن کم می‌باشد. هرچند، مصرف مقادیر زیاد استامینوفن منجر به افزایش تولید NAPQI می‌شود که ممکن است سبب آسیب کبدی شدید شود. عامل دیگر در سمّیت کبدی ناشی از استامینوفن، القاء CYP2E1 به دنبال مصرف مشروبات الکلی است که تولید NAPQI را افزایش می‌دهد. هرچند، خود الکل نیز سوبسترایی برای



شکل ۱۴-۱۱ **متابولیسم بنزوپیرن توسط سیتوکروم P450 و اپوکسید هیدرولاز در جهت تولید بنزو ۷-، ۸- دی‌هیدرودیول-۹، ۱۰- اپوکسید.**



شکل ۱۵-۱۱ **استامینوفن ممکن است توسط آنزیم‌های سولفوترانسفراز و گلوکورونزیل ترانسفراز فاز II توسط CYP2E1 متابولیزه گردد.** متابولیسم CYP2E1 منجر به تولید N- استیل -p- بنزوکینوایمین (NAPQI) خواهد شد. وقتی تولید NAPQI پایین است، NAPQI می‌تواند از طریق کونژوگاسیون با گلوتاتیون به یک متابولیت غیرسمی تبدیل شود؛ هرچند، در صورتی‌که میزان تولید NAPQI زیاد باشد، ممکن است از کونژوگاسیون با گلوتاتیون فرار کرده و با اجزاء سلول کبدی واکنش نموده و سبب آسیب کبدی شود.

این سیتوکروم P450 است و متابولیسم سوبستراهای دیگر CYP2E1 را مهار می‌کند. لذا وسعت آسیب کبدی بستگی به زمان و میزان مصرف استامینوفن دارد. در مقایسه با هر ماده دارویی دیگر، مصرف دوز بالای استامینوفن بیشترین تماس‌های با مراکز کنترل مسمومیت[1] را در ایالات متحده به دنبال دارد. به‌علاوه براساس اطلاعات مربوط به بنیاد کبد آمریکا[2] ۳۵٪ موارد نارسایی‌های کبدی ناشی از مسمومیت با استامینوفن می‌باشند. در ارتباط بالینی ۴-۱۱ به بررسی اثرات الکل برروی متابولیسم استامینوفن پرداخته شده است.

همان‌طور که با مثال‌های مربوط به بنزو [a] پیرن و استامینوفن شرح داده شد، سیتوکروم P450 می‌تواند تولید محصولات سمی کند. گرچه تولید ترکیبات سمی توسط سیتوکروم‌های P450 به معنی آن نیست که آسیب سلولی و یا تومور ایجاد می‌شود. سایر فرایندهای سلولی میزان آسیب سلولی را مشخص خواهند کرد؛ برای مثال، کونژوگاسیون بنزو [a] پیرن -۷،۸- دی‌هیدرودیول -۹، ۱۰- اپوکسید توسط گلوتاتیون ترانسفرازها نقش حفاظتی کلیدی در مهار

1. Poison control centers   2. American Liver Foundation

ارتباط بالینی ۴-۱۱

نقش سیتوکروم P4502E1 در سمّیت کبدی ناشی از استامینوفن

استامینوفن یکی از معمول‌ترین داروهای ضددرد و ضدتب است که مصرف می‌شود. این دارو ممکن است به تنهایی و یا به‌عنوان جزئی از بیش از یک صد شکل درمان‌های غیرتجویزی در دسترس قرار داشته باشد. مسیر متابولیسم استامینوفن در شکل ۱۵-۱۱ نشان داده شده است. مصرف الکل، به‌عنوان یک القاءکننده و سوبسترای CYP2E1، اثر قابل توجهی بر متابولیسم استامینوفن دارد. مصرف الکل به میزان یک بطری ۷۵۰ میلی‌لیتری شراب، قوطی ۱۲ اونسی آبجو، یا ۹ اونس از عرق ۸۰ درجه طی ۶ تا ۷ ساعت منجر به ۲۲٪ افزایش در متابولیسم استامینوفن به‌واسطه CYP2E1 می‌شود که چند ساعت بعد از مصرف الکل نمایان می‌شود. لذا زمان بین آخرین مصرف الکل و استامینوفن ممکن است در ایجاد آسیب کبدی ناشی از استامینوفن بسیار مهم باشد. در فردی که الکل می‌نوشد، متابولیسم استامینوفنی که به‌طور همزمان و یا مدت کوتاهی بعد از نوشیدن الکل مصرف شده است، با تأخیر انجام می‌شود، زیرا اتانل نیز همانند استامینوفن سوبسترایی برای CYP2E1 است و بنابراین برای اتصال با آن رقابت می‌کند. در موارد مصرف مزمن الکل، CYP2E1 القاءشده و مقادیر بیشتر N-استیل-p-بنزوکینون ایمین (NAPQI) تولید می‌شود؛ هرچند، در صورتی‌که الکل همزمان و یا به فاصله کوتاهی بعد مصرف شود، ممکن است واقعاً کبد را در برابر آسیب ناشی از استامینوفن محافظت کند. در صورتی‌که استامینوفن چند ساعت بعد از مصرف الکل مصرف شود، طی این مدت الکل متابولیزه شده است و افزایش میزان CYP2E1 برای متابولیسم استامینوفن به NAPQI در دسترس قرار دارد که خطر آسیب کبدی را افزایش می‌دهد.

طول زمان و میزان مصرف روزانه الکل بر روی بیان CYP2E1 در سلول‌های کبدی اثر می‌گذارد. میزان استامینوفن مصرفی نیز یک عامل تعیین‌کننده مهم است، زیرا دوزهایی که به‌طور طبیعی توصیه می‌شوند، معمولاً مقادیر کافی NAPQI برای تولید آسیب سلول کبدی را تولید نمی‌کنند. دوزهای بالاتر استامینوفن خطر آسیب سلول کبدی را افزایش می‌دهد، به‌طوری که داروی بیشتری از طریق مسیر CYP2E1 متابولیزه خواهد شد. هر دو مسیر سولفاسیون و گلوکورونیداسیون برای تعیین میزان استامینوفنی که توسط CYP2E1 متابولیزه می‌شود، ضروری هستند. به‌علاوه، مقادیر گلوتاتیون داخل‌سلولی اهمیت زیادی دارد، زیرا گلوتاتیون کونژوگه‌هایی با NAPQI ایجاد می‌کند تا کبد را در مقابل این ترکیب واکنشگر محافظت کند. در حضور مقادیر زیاد NAPQI، گلوتاتیون سریعاً تخلیه شده و دیگر نمی‌تواند سبب حفاظت در برابر این آسیب شود.

تولید اداکت DNA و کاهش فعالیت سرطانزایی آن بازی می‌کند. فعالیت‌های مربوط به سیستم‌های آنزیمی سم‌زدایی مختلف، شامل واکنش‌های کونژوگاسیون نظیر گلوکورونیداسیون و سولفاسیون، وضعیت سیستم ایمنی، وضعیت تغذیه، استعداد ژنتیکی، و تماس با مواد شیمیایی محیطی مختلف، همگی نقش‌های کلیدی را در تعیین وسعت سمّیت و آسیب سلولی به‌واسطه P450 دارند. با وجود اینکه به‌نظر می‌رسد که داشتن آنزیم‌هایی که پتانسیل تولید ترکیبات سمی را دارند برای سیستم‌های پستانداران نامناسب باشد، هدف از وجود سیستم سیتوکروم P450 افزودن یا در معرض‌قراردادن گروه‌های عاملی است که ملکول را قطبی‌تر و یا حساس‌تر به متابولیسم توسط سایر سیستم‌های آنزیمی سم‌زدایی کند؛ تولید متابولیت‌های سمی جزء عوارض ناخواسته این فرایند است.

با وجود اینکه اکثریت کثیری از سوبستراهای مربوط به سیتوکروم‌های P450 (جدول ۱-۱۱ را ببینید) ترکیبات خارجی هستند، برخی فعالیت‌های داخلی نیز متصور می‌باشد. به‌نظر می‌رسد CYP1A1 و 1A2 به‌ترتیب در کاتابولیسم هِم و متابولیسم استرادیول نقش دارند. همچنین شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهد اعضاء زیرخانواده‌های CYP2A،

2B، 2C و 3A در متابولیسم تستوسترون و اعضاء زیرخانواده‌های 2D و 2E در به ترتیب متابولیسم کاتکول آمین‌ها و گلوکونئوژنز همکاری دارند.

۶-۱۱ • سیتوکروم‌های P450: القاء و مهار

واضح است که میزان و فعالیت سیتوکروم‌های P450 در هر فردی به میزان زیادی بر روی اثر یک داروی یا گزنوبیوتیک خاص بر روی این سیستم تأثیر می‌گذارد. لذا ترکیباتی که فعایت P450 را مهار یا القاء می‌کنند، به همراه چندشکلی‌های موجود در یک ژن P450، می‌توانند نتایج غیرمنتظره‌ای را به دنبال داشته باشند.

تداخلات دارو-دارو

بسیاری از داروها تولید سیتوکروم P450 متابولیزه‌کننده خود را القاء می‌کنند. داروهای دیگر فعالیت P450 را مهار می‌کنند. تغییر متابولیسم یک داروی خاص از میزان پیش‌بینی شده آن ممکن است سبب عوارض جانبی و غیرمنظره شود و به‌خصوص در مورد افرادی که ترکیبی از داروها را مصرف می‌کنند، اهمیت خاصی دارد. در مورد داروهایی که برای حذف از بدن وابسته به متابولیسم P450 هستند، مهار منجر به تجمع دارو به میزانی می‌شود که ممکن است سمی باشد. برعکس، القاء ایزوفرم P450که برای متابولیسم یک داروی خاص مورد نیاز است، منجر به متابولیسم بیش از حد و غلظت‌های کمتر از حد مؤثر می‌شود.

اثرات ناخواسته حاصل از القاء یا مهار سیتوکروم‌های P450 توسط داروهای دیگر را تداخلات دارو-دارو[1] گویند. در صورتی که این داروهای القاءکننده یا مهارکننده با داروهای دیگری داده شوند که به‌طور طبیعی توسط آنزیم‌های P450 متابولیزه می‌گردند، عمر این داروها تغییر خواهد کرد. در صورتی که این داروها بر روی سیستم‌های حیاتی بدن تأثیر داشته باشند، نتیجه می‌تواند کشنده باشد. برای مثال، CYP2E1 توسط الکل یا ایزونیازید القاء می‌شود. این آنزیم داروهای بیهوشی نظیر هالوتان و انفلوران را به ترکیباتی متابولیزه می‌کند که به پروتئین‌های کبدی آسیب می‌رسانند. سپس سیستم ایمنی به پروتئین‌های غیرطبیعی حمله کرده و سبب هپاتیت می‌شود. افرادی که فعالیت بیش از حد طبیعی CYP2E1 را دارند، به دنبال مصرف الکل در خطر بالای این نوع واکنش هپاتیتی نسبت به یک داروی بیهوشی قرار می‌گیرند.

تداخلات دارو-دارو همچنین با CYP3A4 رخ می‌دهد که مهمترین P450 متابولیزه-کننده دارو است و P450ای می‌باشد که به بیشترین میزان در کبد و روده کوچک وجود دارد. مقادیر CYP3A4 توسط ریفامپیسین، داروهای ضدتشنج نظیر کربامازپین و فنی‌توئین، و گلوکوکورتیکوئیدهایی نظیر دگزامتازون القاء می‌شوند و توسط عوامل ضدقارچی نظیر کتوکونازول، مهارکننده‌های پروتئاز HIV، مسدودکننده‌های کانال کلسیمی، سیکلوسپورین،

1. Drug-drug interactions

آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر اریترومایسین، داروهای ضدافسردگی SSRI، و حتی آب گریپ‌فروت، مهار می‌گردند. تعداد بسیار کمی از ترکیبات متعددی که توسط این آنزیم متابولیزه می‌شوند، در جدول ۱-۱۱ فهرست شده‌اند.

به راحتی می‌توان دریافت که مخلوط القاءکننده‌ها و یا مهارکننده‌های CYP3A4 با داروهای مختلف (که خودشان می‌توانند القاءکننده یا مهارکننده باشند) ممکن است اثرات ناخواسته یا حتی کشنده داشته باشند. مصرف ریفامپیسین به عنوان یک القاءکننده CYP3A4 همرا با داروهای ضدبارداری خوراکی که توسط CYP3A4 متابولیزه می‌شوند، منجر به کاهش کارایی داروهای ضدبارداری خوراکی شده که نتیجه آن حاملگی‌های ناخواسته می‌باشد. مصرف کتوکونازول یا حتی نوشیدن آب گریپ‌فروت که هر دو CYP3A4 را مهار می‌کنند، همراه با ضدانعقاد وارفارین می‌تواند منجر به خونریزی وسیع شود. عوارض بالینی مرتبط با مهار یا القاء آنزیم‌های متابولیزه‌کننده-دارو در ارتباط بالینی ۳-۱۱ و ارتباط بالینی ۵-۱۱ آورده شده است.

مکـانیسم‌های مهار سیتـوکروم‌های P450 در سطح رونـویسی یا بعد از رونـویسی (برای مثال، تثبیت mRNA یا کاهش تخریب پروتئین) می‌باشند. امکانپذیر نیست که نحوه القاء براساس ترکیب القاءکننده را پیش‌بینی نمود. پیچیدگی فرایند القاء با CYP2E1 در انسان در مقابل کبد موش صحرایی نشان داده می‌شود. پروتئین CYP2E1 در هر دو گونـه توسط ملکول‌های آلی کوچک نظیر اتانل، استن یا پیـرازول، یا تحت ناشتایی یا حالات دیابتی، القاء می‌شود. در انسان، مقادیر mRNA مربوط به پروتئین تحت تأثیر قرار نگرفته و القاء احتمالاً ناشی از تثبیت CYP2E1 انسانی در برابر تخریب پروتئولیتیک می‌باشد. هر چند، در موش‌های دیابتی یک القاء شش برابر پروتئین CYP2E1 همراه با یک افزایش ۱۰ برابر در mRNA بدون افزایش در رونویسی ژن است که تثبیت mRNA را مطرح می‌کند.

برای برخی عوامل القاءکننده وجود پروتئین‌های گیرنده سیتوزولی اختصاصی نشان داده شده است. یکی از وسیع‌ترین مطالعات انجام‌شده بر روی گیرنده هیدروکربن آریلی (یا Ah) می‌باشد که با ۸،۷،۳،۲- تتراکلرودی‌بنزو-p-دیوکسین[1] (TCDD) تعامل نموده و سبب القاء CYP1A1، CYP1A2 و CYP1B1 می‌شود. این مثـالی از ترکیبی است که بـرای مدت‌های طولانی در محیط‌هـای لیپیدی سلول بـاقی مانـده و سرطانزایی را القاء می‌کند. هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای لیگاندهایی برای گیرنده Ah هستند و تولید یک کمپلکس لیگاند-گیرنده می‌کنند که توسط جابه‌جاکننده هسته‌ای گیرنده Ah[2] (Arnt) به داخل هسته جابه‌جا می‌شود که در آنجا به عناصر پاسخ اختصاصی موجود در نواحی تنظیمی فرادست ژن‌های سیتوکروم P450 اتصال می‌یابد. شکل ۱۶-۱۱ این فرایند را نشان می‌دهد.

ارتباط بالینی ۵-۱۱

القاء سیتوکروم P450: تداخلات دارویی و عوارض جانبی

القاء سیتوکروم‌های P450 ممکن است سبب کاهش اثرات درمانی داروها شود، زیرا افزایش میزان P450 کبدی منجر به افزایش متابولیسم و بنابراین غیرفعال‌سازی و یا دفع داروها شود. القاء سیستم P450 ممکن است اثرات جانبی ناشی از تولید متابولیت‌های سمی را داشته باشد (ارتباط بالینی ۴-۱۱ را نیز ببینید).

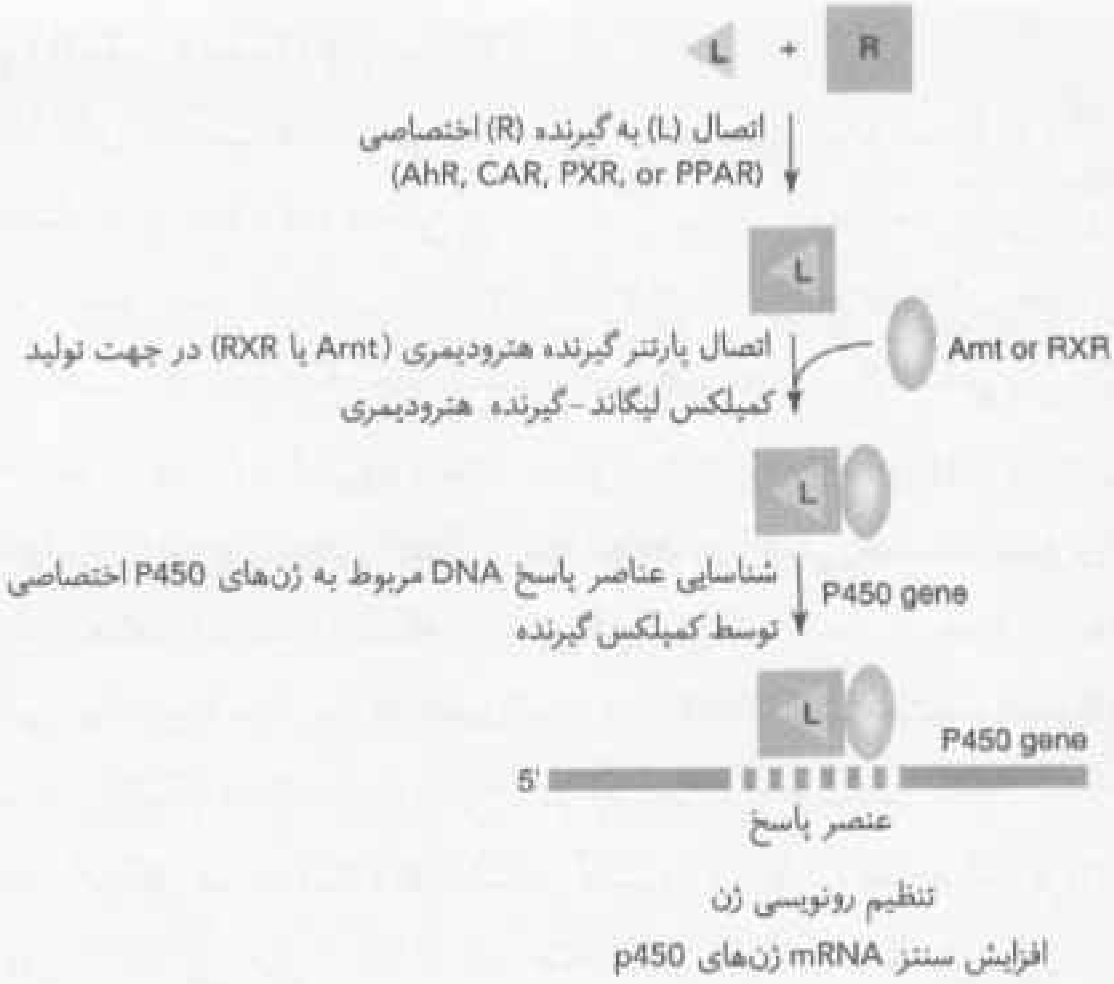
برای مثال، القاء CYP3A4 توسط داروی ضد سل ریفامپیسین ممکن است به‌میزان زیادی حذف داروی ضدبارداری خوراکی اتینیل استرادیول را افزایش دهد که نتیجه آن مقادیر پلاسمایی کمتر دارو می‌باشد که خطر بارداری را افزایش می‌دهد. درمان با داروهای ضدتشنج فنی‌توئین و کاربامازپین ممکن است سبب القاء CYP3A4 شده و قدرت ضدبارداری اتینیل استرادیول را کاهش دهد. وقتی خانمی اتینیل استرادیول را به‌عنوان یک داروی ضدبارداری خوراکی همراه با یک القاءکننده CYP3A4 مصرف می‌کند، لازم است دوز داروی ضدبارداری را افزایش دهد و یا از یک روش یا داروی ضدبارداری دیگر استفاده کند.

عامل علفی St. Jhon's wort نیز که استفاده گسترده‌ای دارد و بدون نسخه قابل‌خریداری است، سبب القاء فعالیت CYP3A4 می‌شود که این موضوع را مطرح می‌کند که افرادی که علف می‌خورند ممکن است از فواید داروهایی محروم شوند که سوبستراهای CYP3A4 هستند. احتمال کاهش مقادیر پلاسمایی داروهای ضدبارداری خوراکی، داروهای آنتی‌پروتئاز HIV، داروی سرکوب‌کننده ایمنی سیکلوسپورین با برخی داروهای استاتینی مورد استفاده برای کاهش مقادیر کلسترول وجود دارد، زیرا تمامی آنها سوبسترایی برای CYP3A4 هستند. از آنجایی‌که St. Jhon's wort به‌عنوان یک ماده طبیعی در نظر گرفته می‌شود، افراد ممکن است این عامل را بدون اطلاع پزشک خود و یا بدون دانستن اثرات آن بر روی کارایی سایر داروهای مصرفی دیگر مصرف کنند.

1. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
2. Ah receptor nuclear translocator

ارتباط بالینی ۵-۱۱ (ادامه)

هستند. از آنجایی که St. Jhon's wort به‌عنوان یک ماده طبیعی در نظر گرفته می‌شود، افراد ممکن است این عامل را بدون اطلاع پزشک خود و یا بدون دانستن اثرات آن بر روی کارایی سایر داروهای مصرفی دیگر مصرف کنند.



شکل ۱۶-۱۱ تعامل یک لیگاند با گیرنده خود و گیرنده پارتنر در جهت تولید کمپلکس هترودیمری گیرنده، القاء اشکال سیتوکروم P450 را آغاز می‌کند.

سیستم گیرنده دیگر ژن‌های P450، گیرنده پرگنان X[1] (PXR) می‌باشد که ژن CYP3A را تنظیم می‌کند. پرگنان اشاره به ترکیبات استروئیدی ۲۱ کربنه‌ای نظیر متابولیت پروژسترونی 5α-پرگنان-۳،۲۰-دیون دارد که لیگاندی برای PXR هستند و القاءکننده قوی ژن CYP3A4 انسانی می‌باشند. علاوه بر استروئیدهای ۲۱ کربنه، ترکیبات ساختمانی غیرمشابه نظیر کربامازپین (داروی مورد استفاده در درمان تشنج) و ریفامپیسین (یک داروی ضد سل)، و همچنین St. Jhon's wort (یک عامل گیاهی غیرتجویزی مورد استفاده در درمان ناهنجاری‌های خلق و خوی)، لیگاندهایی برای PXR هستند. PXR به گیرنده رتینوئید X[2] اتصال یافته تا تولید یک کمپلکس هترودیمری (PXR-RXR) کند که به عناصر پاسخ اختصاصی موجود در نواحی پهلویی ′۵ ژن‌های CYP3A متصل می‌شود. بیاد داشته باشید که تقریباً ۵۰٪ داروهای تجویزی با این شکل سیتوکروم P450 متابولیزه می‌شوند.

فنوباربیتال القاءکننده دیگر ژن‌های مربوط به سیتوکروم P450 است. این اثر القایی به‌واسطه گیرنده دائمی آندروستان[3] (CAR) انجام می‌شود که با RXR نیز کمپلکس هترودیمری تشکیل می‌دهد تا با عنصر پاسخ اختصاصی خود در ناحیه ′۵-پهلویی ژن‌های CYP2B تعامل کند. دو استروئیدی آندروستانی داخلی، شامل آندروستانول[4] و آندروستنول[5]، نیز لیگاندهایی برای CAR هستند و، وقتی هر کدام از این دو به CAR اتصال دارند، مانع تعامل کمپلکس CAR-RXR با پروتئین SRC-1 می‌شود. SRC -1 کوفاکتوری از گیرنده‌های هسته‌ای است و برای فعال‌سازی رونویسی توسط CAR لازم است. تجویز فنوباربیتال یا سایر القاءکننده‌های فنوباربیتال-مانند سبب جایگزینی لیگاندهای آندروستانی می‌شود که امکان اتصال SRC-1 و رونویسی ژن CYP2B را فراهم می‌سازد.

1. Pregnane X receptor 2. Retinoid X receptor 3. Constitutive androstane receptor 4. Androstanol 5. Androstenol

چندشکلی‌های ژنتیکی سیتوکروم P450

علاوه بر تماس با ژن‌های القاءکننده مختلفی که ممکن است الگوی بیان سیتوکروم P450 را در کبد و سایر اعضاء تغییر دهد، افراد ممکن است از نظر سرعت متابولیسم برخی داروها با یکدیگر اختلاف داشته باشند که علت آن ژن‌ها یا آلل‌های سیتوکروم P450 بی‌همتایی (یعنی، چندشکلی) است که دارند. یک چندشکلی یک توالی متفاوت DNA می‌باشد که حداقل در ۱٪ جمعیت وجود دارد. این تفاوت‌ها در توالی‌های DNA می‌تواند منجر به تفاوت‌هایی در متابولیسم دارویی شود. از آنجایی اینها تنوع‌های ژنتیکی هستند، بسیاری از آنها در گروه‌های نژادی خاصی وجود دارند که به همین دلیل ممکن است با مصرف داروها دچار عوارض جانبی بیشتری شوند. برآورد شده است که ۴۰٪ اشکال مختلف سیتوکروم P450 انسانی که گزنوبیوتیک‌ها را متابولیزه می‌کنند، چندشکلی هستند.

چندشکلی‌های ژنتیکی در CYP2D6 به شکل گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و ۶۵ آلل مختلف مورد شناسایی قرار گرفته است. جمعیت را می‌توان براساس میزان بیان CYP2D6 به دو گروه متابولیزه‌کننده شدید و متابولیزه‌کننده ضعیف تقسیم نمود. در صورتی‌که راه دیگری برای پاکسازی یک داروی خاص از سیستم وجود نداشته باشد، متابولیزه‌کننده‌های ضعیف ممکن است در خطر واکنش‌های دارویی جانبی قرار داشته باشند. برعکس، ممکن است بسیاری از داروها در متابولیزه‌کننده‌های شدید بی‌تأثیر باشند. افراد زیادی با خواستگاه اتیوپیایی و عربستان صعودی، بیان بالای CYP2D6 را نشان می‌دهند. این ایزوفرم انواع مختلفی از داروها را متابولیزه نموده و آنها را بی‌تأثیر می‌کند؛ بسیاری از داروهای ضدافسردگی و نورولپتیک[1] مثال‌های مهمی هستند. در حالت عکس، فعال‌سازی پیش‌سازهای دارویی ممکن است به شکل گسترده‌ای انجام شود؛ کدئین با سرعت بسیار بالایی به مقادیر زیادی مورفین فعال می‌شود.

برعکس، بسیاری از افراد فاقد 2D6 فعال هستند. این افراد مستعد سمّیت دارویی ناشی از عوامل ضدافسردگی یا نورولپتیک قرار دارند؛ ولی به دلیل عدم فعال‌سازی، کدئین در آنها اثری ندارد. پرهگزیلین[2] (یک مسدودکننده کانال کلسیمی) به دلیل نوروپاتی ایجادشده در بیماران دارای 2D6 غیرفعال، از داروخانه‌ها جمع‌آوری شد. حتی ممکن است در بیماران دچار کمبود 2D6، برداشت مسدودکننده بتا (برای مثال، پروپرانولول) مختل شود. ارتباط بالینی ۶-۱۱ به بحث پیرامون اثرات چندشکلی می‌پردازد.

با وجود اینکه چندشکلی ژنتیکی یک سیتوکروم P450 ممکن است بر روی متابولیسم یک مجموعه مجزا از ترکیبات تأثیر داشته باشد، می‌توان انتظار داشت که چندشکلی‌های ژنتیکی سیتوکروم P450 ردوکتاز، تنها دهنده الکترون به ۵۰ عضو کلاس سیتوکروم‌های P450 میکرزومی، اثرات کلی و برجسته‌ای بر روی متابولیسم هر دو سوبستراهای داخلی و خارجی داشته باشد. در حقیقت، ناتوان‌سازی کامل ژن سیتوکروم P450 ردوکتاز در مدل

1. Neuroleptic 2. Perhexiline

ارتباط بالینی ۶-۱۱

چندشکلی‌های ژنتیکی آنزیم‌های P450

آلل‌های متعددی برای تقریباً ۴۰٪ ژن‌های P450 انسانی نشان داده شده است. این چندشکلی‌های ژنتیکی ممکن است تولید پروتئین‌های ناقص P450 کنند. شرحی بر CYP21 چندشکلی و اهمیت آن در متابولیسم یک ترکیب داخلی در ارتباط بالینی ۱-۱۱ آورده شده است. عدم وجود یک فعالیت سیتوکروم P450 ممکن است منجر به مشکلات زیادی به‌دلیل تجمع داروهای درمانی شود که نمی‌توانند متابولیزه گردند. کشف اثرات کاهنده فشارخون تشدیدشده با داروی ضدفشار خون دبریزوکین منجر به شناسایی افرادی شد که به‌شکل غیرمؤثری سوبستراهای CYP2D6 را متابولیزه می‌کنند. تقریباً ۵٪ تا ۱۰٪ قفقازی‌ها، ۸٪ آفریقایی‌ها و آفریقایی-آمریکایی‌ها، و ۱٪ آسیایی‌ها دچار کمبود فعالیت کاتالیتیکی CYP2D6 می‌باشند. علاوه‌بر دبریزوکین، داروهای دیگری که توسط CYP2D6 متابولیزه می‌شوند شامل آسپارتئین، آمی‌تریپتیلین، دکسترومتورفان، و کدئین می‌باشند. در مورد کدئین، CYP2D6 در افراد طبیعی، O-دمتیلاسیون حدود ۱۰٪ کدئین به مورفین را کاتالیز می‌کند. افرادی که فاقد CYP2D6 هستند، قادر به کاتالیز این واکنش نیستند و به‌همین دلیل اثرات ضد درد کدئین را به‌دست نمی‌آورند.

یک چندشکلی مرتبط با CYP2C19 در افرادی نشان داده شده است که متابولیزه‌کننده ضعیف مفنی‌توئین، داروی مورد استفاده در درمان صرع، هستند؛ CYP2C19 کربن ۴ S-اناتیومر مفنی‌توئین را هیدروکسیله می‌کند تا اثر فیزیولوژیک آن را غیرفعال کند. متابولیزه‌کننده‌های ضعیف این دارو به میزان زیادی از اثرات تسکینی بیشتر دوزهای طبیعی رنج می‌برند. حدود ۱۴٪ تا ۲۲٪ جمعیت‌های آسیایی، ۴٪ تا ۷٪ آفریقایی و آفریقایی-آمریکایی، و ۳٪ قفقازی فاقد شکل فعال CYP2C19 هستند.

چندشکلی‌های CYP2C9 در کمتر از ۰٫۰۰۳٪ جمعیت‌های آفریقایی یا آفریقایی- آمریکایی، ۰٫۰۸٪ آسیایی، و ۰٫۳۶٪ قفقازی وجود دارد. عدم وجود یک CYP2C9 وظیفه‌دار عوارض جدی را در متابولیسم S-وارفارین به همراه دارد که یک داروی خوراکی مورد استفاده در جلوگیری از انعقاد خون در بیمارانی است که از یک حمله قلبی یا یک سکته رنج می‌برند و این دارو را به منظور پیشگیری از ایجاد لخته‌های مکرر خطرناک مصرف می‌کنند. مقادیر پلاسمایی دارو می‌بایست در یک دامنه اختصاصی حفظ شود، زیرا مقادیر زیادی آن منجر به خونریزی کنترل‌نشده و احتمالاً مرگ می‌شود. وارفارین توسط CYP2C9 متابولیزه و حذف می‌شود. CYP2C9*3 واریانت آللی است که در آن با جایگزینی ایزولوسین به‌جای لوسین در ریشه ۳۵۹، فعالیت آنزیمی به‌میزان زیادی از دست می‌رود. افراد دچار کمبود CYP2C9 ممکن است نیاز به ۰/۵ تا 1 mg وارفارین در هر هفته، به‌جای تجویز ۴ تا 5 mg در روز به افراد دارای CYP2C9، داشته باشند. در صورتی‌که یک دوز ۵ میلی‌گرمی وارفارین توسط فردی مصرف شود که فاقد CYP2C9 وظیفه‌دار است، در اثر یک بریدگی ساده امکان رخداد خونریزی غیرقابل‌کنترل وجود دارد.

حیواتی سبب مرگ در مرحله جنینی این حیوانات می‌شود. اخیراً اثرات عمیق جهش‌های انسانی تغییردهنده این ژن شرح داده شده است (ارتباط بالینی ۷-۱۱).

مهار درمانی سیتوکروم P450

از آنجایی‌که سیتوکروم‌های P450 در تقریباً تمامی موجودات وجود دارند و چون این آنزیم‌ها نقش‌های بسیار مهمی را در هوموستاز سلولی بازی می‌کنند، مهار انتخابی آنها اهمیت بالینی دارد. برای مثال، مهارکننده‌های آزول[1] (کتوکونازول[2]، ایتراکونازول[3]، و فلوکونازول[4]) به‌منظور کنترل عفونت‌های مخمری در بیماران ایدزی، سرطانی تحت شیمی‌درمانی، و تحت درمان با داروهای سرکوب‌کننده ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مخمر، CYP51

1. Azole 2. Ketoconazole 3. Itraconazole 4. Fluconazole

ارتباط بالینی ۷-۱۱

چندشکلی‌های ژنتیکی NADPH-سیتوکروم P450 ردوکتاز: سندروم آنتلی-بیکسلر (OMIM۲۰۷۴۱۰)

جهش‌هایی در NADPH- سیتوکروم P450 ردوکتاز یافت شده‌اند که منجر به فنوتیپ مالفورماسیون‌های اسکلتی در بیمار می‌شوند که با کرانیوسینوستوزها (بسته‌شدن زودرس درزهای جمجمه) یا سینوستوزهای رادیو-هومرال، و یا فمور کمانی مشخص می‌گردند؛ مجموعه این خصوصیات بالینی را سندروم آنتلی-بیکسلر[1] گویند. این بیماران همچنین دچار اختلال در استروئیدوژنز و هیپرپلازی مادرزادی آدرنال[2] (CAH) هستند. همان‌طور که در ارتباط بالینی ۱-۱۱ شرح داده شد نقص CYP21A2 معمول‌ترین علت CAH است. از آنجایی که کمبود سیتوکروم P450 ردوکتاز پتانسیل تأثیر بر روی سه سیتوکروم P450 استروئیدوژنیک (CYP های 19A، 17A و 21A) را دارد، الگوهای متغیر و غیرطبیعی از هورمون‌های استروئیدی در این موارد مشاهده می‌گردد که نتیجه آن ایجاد صفات مردانه در زنان و کاهش این صفات در مردان می‌باشد. در برخی مبتلایان به کمبود سیتوکروم P450 ردوکتاز، مسیرهای درگیر در نمو رویانی اسکلت نیز به شکل واضحی تحت تأثیر قرار می‌گیرند، و متابولیسم داروها به‌واسطه سیتوکروم P450 در حداقل برخی از این بیماران دچار اختلال می‌باشد. به‌دلیل اینکه فراوانی در قسمت انتقال الکترون سیستم میکروزومی سیتوکروم P450 وجود ندارد، برحسب شدت اثر بر فعالیت آن، انتظار می‌رود که نقص‌های سیتوکروم P450 ردوکتاز اثرات متغیر و فنوتیپ متفاوتی داشته باشد. به‌علاوه، سیتوکروم‌های P450 مختلفی می‌توانند با ریشه‌های سطحی این ردوکتاز تعامل کنند، و بنابراین به شکل متمایزی تحت تأثیر جهش‌هایی در این ریشه‌ها قرار گیرند. لذا برحسب لوکوس جهش در ساختمان ردوکتاز (شکل ۴-۱۱)، و تغییر حاصل در فعالیت‌های آنزیمی یا تعاملات پروتئین- پروتئین، جهش‌ها ممکن است به میزان زیادی از نظر شدت و فنوتیپ حاصل متفاوت باشند.

1. Antley-Bixler syndrome
2. Congenital adrenal hyperplasia

دمتیلاسیون ملکول‌های استرول را در هنگام سنتز ارگوسترول مهار می‌کنند که یک لیپید غشایی مهم است. در انسان، یک شکل مرتبط P450، یعنی CYP51A1، دمتیلاسیون لانوسترول را کاتالیز می‌کند، واکنشی که برای سنتز کلسترول ضروری است. با وجود اینکه پروتئین‌های انسانی و مخمری CYP51 مشابه هستند، به اندازه کافی تفاوت وجود دارد که عوامل ضدقارچی آزولی به عنوان مهارکننده‌های مؤثر تولید ارگوسترول عمل کنند. هرچند، همان‌طور که قبلاً مورد بحث قرار گرفت، این عوامل ممکن است سبب القاء یا مهار سیتوکروم‌های P450 بومی انسانی شده و احتمالاً پدیده تداخل دارو-دارو را به‌وجود آورند.

برخی تومورها، نظیر تومورهای پستان، برای رشد وابسته به استروژن هستند. لذا احتمال دارد مهار سنتز استروژن بدون مهار تولید سایر هورمون‌های استروئیدی یک ابزار شیمی درمانی انتخابی در جهت کاهش و حذف تومور باشد. CYP19A1 به‌عنوان سیتوکروم p450ای که تولید استرادیول از آندروستن‌دیون را کاتالیز می‌کند، هدف جذابی برای این نوع تداخل می‌باشد. یک نوع به‌خصوص انتخابی مهارکننده، یک مهارکننده مکانیسم-محور یا خودکشنده می‌باشد. این ترکیبات شباهت زیادی با سوبسترای یک آنزیم دارند: ولی طی نوسازی کاتالیتیک با گروه پروستتیک یا پروتئین آنزیم تولید یک محصول مهاری غیرقابل برگشت می‌کنند. این نوع مهارکننده‌ها برای یک شکل سیتوکروم P450 بسیار اختصاصی هستند بنابراین یک رهیافت ماهرانه برای طراحی دارو می‌باشند.

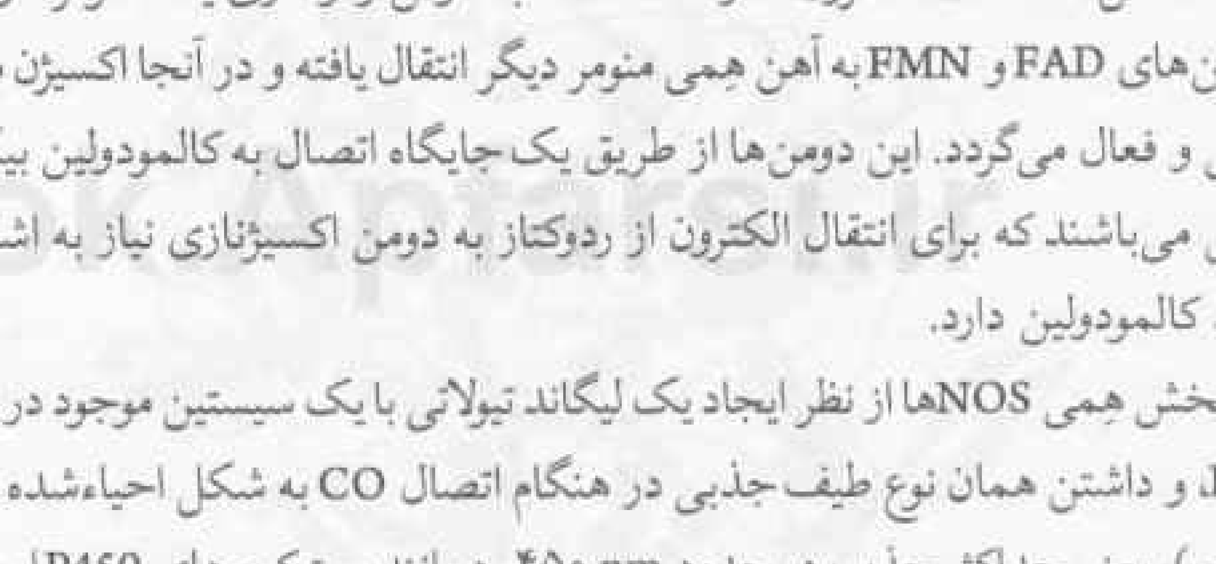
به راحتی می‌توان دریافت که بدون شناخت متابولیسم دارو و تداخلات دارویی حاصل

از سیستم سیتوکروم P450، به‌خصوص در مواردی که نیاز به تجویز داروهای متعدد مثلاً در بیماران مسن است، نمی‌توان تجویز ایمن دارو را انجام داد. بسیار مهم است که مشخص کنیم داروهای درمانی به چه شکلی متابولیزه می‌شوند و آیا اشکال سیتوکروم P450 می‌توانند توسط ترکیبات مختلف مهار شوند. قبل از اینکه داروها به تأیید نهایی برای مصرف عمومی انسان برسند، فرایند تأیید توسط اداره غذا و دارو (FDA)، نیاز به اطلاعاتی وسیعی در خصوص متابولیسم داروها دارد.

۱۱-۷ • اکسید نیتریک سنتازها: خصوصیات و فعالیت‌های آنزیمی

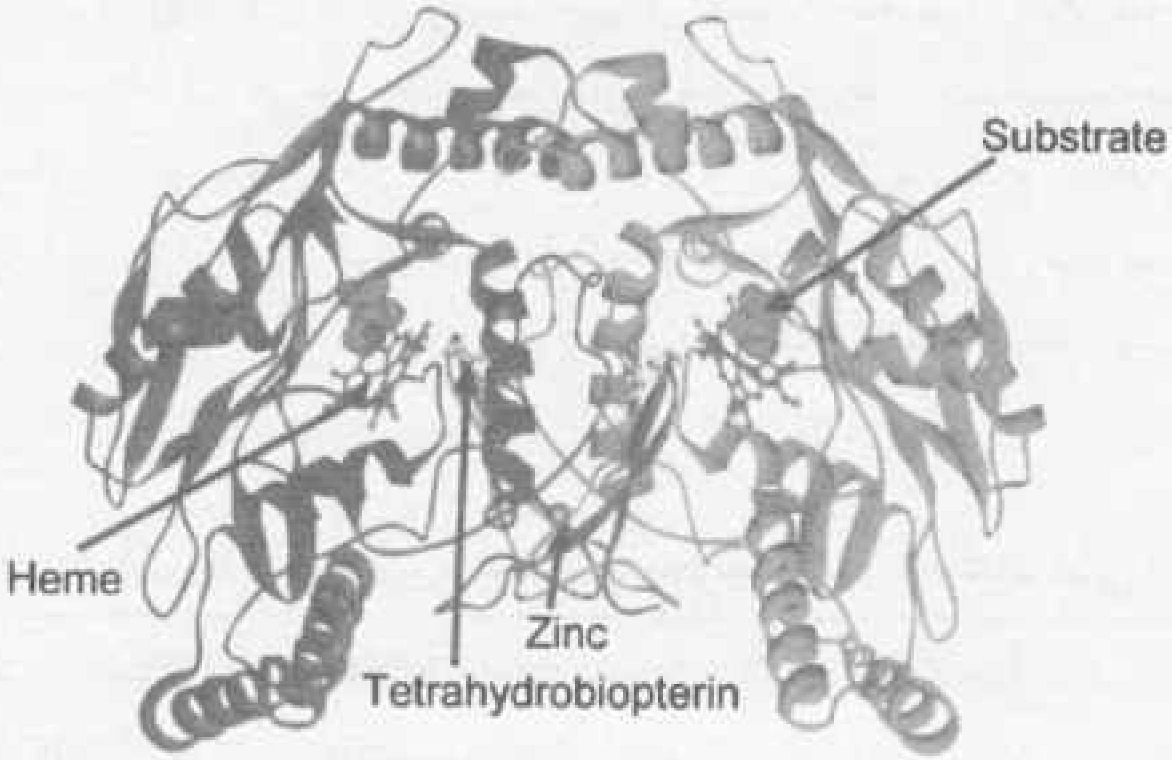
اکسید نیتریک سنتازها[1] (NOSs) آنزیم‌های حاوی هِم و فلاوین هستند که سنتز اکسید نیتریک (NO) را از طریق دو واکنش منواکسیژنازی متوالی مشابه انواع موجود در سیستم‌های سیتوکروم P450 کاتالیز می‌کنند. NOSها دیمرهای وظیفه‌دار با دو دومن اصلی هستند: یکی دومن اکسیژنازی حاوی هِم که از نظر ساختمانی ارتباطی با سیتوکروم‌های P450 ندارد، و دیگری یک دومن ردوکتازی حاوی فلاوین که از نظر ساختمانی مشابه P450 ردوکتاز است (شکل ۱۷-۱۱). الکترون‌ها از NADPH به دومن ردوکتازی یک منومر، از طریق فلاوین‌های FAD و FMN به آهن هِمی منومر دیگر انتقال یافته و در آنجا اکسیژن ملکولی متصل و فعال می‌گردد. این دومن‌ها از طریق یک جایگاه اتصال به کالمودولین بیکدیگر متصل می‌باشند که برای انتقال الکترون از ردوکتاز به دومن اکسیژنازی نیاز به اشغال آن توسط کالمودولین دارد.

بخش هِمی NOSها از نظر ایجاد یک لیگاند تیولاتی با یک سیستین موجود در پروتئین NOS، و داشتن همان نوع طیف جذبی در هنگام اتصال CO به شکل احیاءشده (شکل فرو هِم)، یعنی حداکثر جذب در حدود ۴۵۰ nm، همانند سیتوکروم‌های P450 است. هر چند، دومن اکسیژنازی NOS ساختمان بسیار متفاوتی نسبت به سیتوکروم‌های P450 دارد (ساختمان کریستالی دومن اکسیژنازی NOS شکل ۱۸-۱۱ را با این ساختمان در سیتوکروم P450 در شکل ۱-۱۱ مقایسه کنید). علاوه‌بر بخش هِمی و جایگاه اتصالی سوبسترا، دومن‌های اکسیژنازی NOSs همچنین حاوی یک جایگاه اتصالی برای تتراهیدروبیوپترین

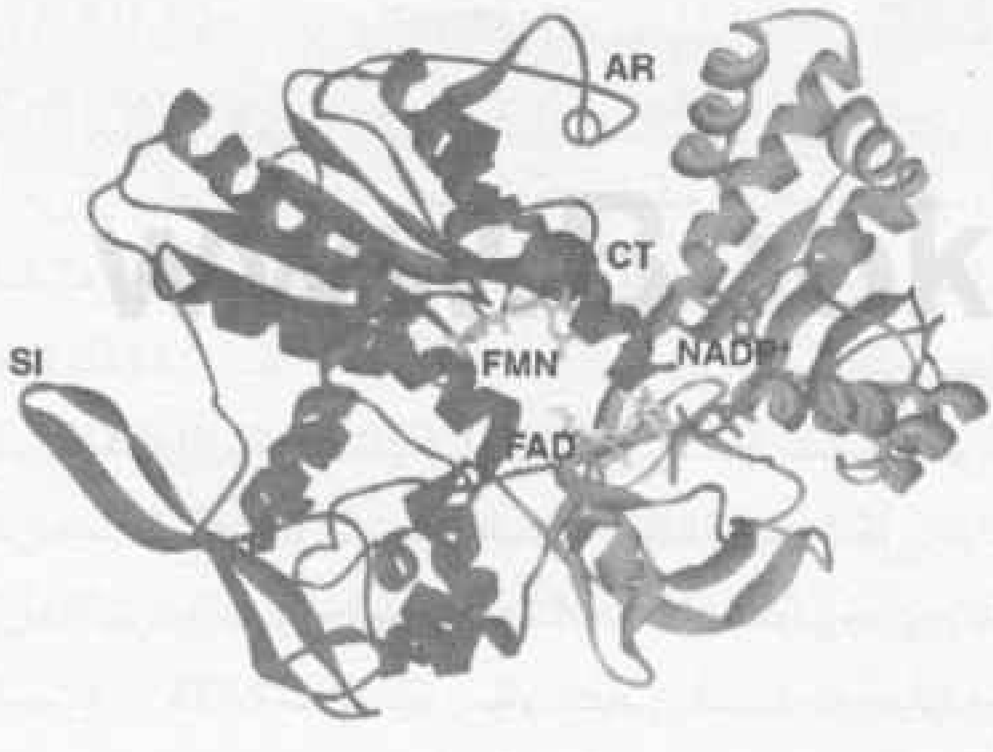


شکل ۱۷-۱۱   یک ساختمان قطعه‌ای اکسید نیتریک سنتاز عصبی که موقعیت نسبی گروه‌های پروستتیک و کوفاکتورها را نشان می‌دهد.

1. Nitric oxide synthases



شکل ۱۸-۱۱ **مدل ساختمان دیمری دومن همی NOSIII گاوی که پروتوپورفیرین IX (قرمز) و گروه‌های پروستتیک تتراهیدروبیوپترین را نشان می‌دهد.** این دو منومر به‌ترتیب با رنگ آبی روشن و آبی تیره نشان داده شده‌اند. سوبسترای L-آرژینین (سبز) در جایگاه فعال NOSIII قرار دارد. یک اتم روی در فصل مشترک بین دو منومر قرار دارد.

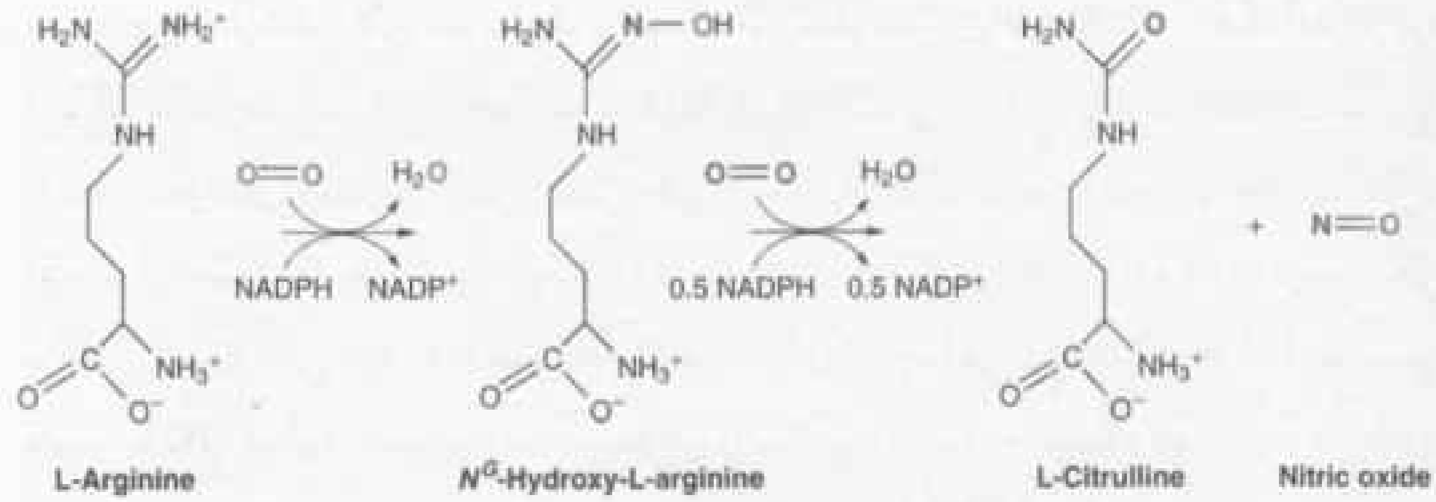


شکل ۱۹-۱۱ **دیاگرام نواری دومن ردوکتازی nNOS مشتق از ساختمان کریستالی آن.** مشابه با سیتوکروم p450 ردوکتاز، چندین زیردومن وجود دارند: دومن اتصالی FMN (آبی)، دومن اتصالی FAD/NADPH (سبز)، و دومن اتصالی مداخله‌گر (ارغوانی). برخلاف P450 ردوکتاز، nNOS ردوکتاز حاوی یک جایگاه اتصال به کالمودولین (در این دیاگرام مشخص نیست)، و نواحی تنظیمی (قرمز) در انتهای کربوکسیل (CT)، در دومن AR) FMN)، و در دومن متصل‌کننده (SI) است. کوفاکتورها با مدل‌های میله‌ای نشان داده شده‌اند: آبی، FMN؛ زرد، FAD؛ و قرمز، $NADP^+$.

که به‌طور واضحی در انتقال الکترون فعالیت دارد، و یک اتم روی چهار-کوئوردیناتسی هستند که برای یکپارچگی ساختمانی مهم است.

دومن ردوکتاز NOS از نظر ساختمانی بسیار شبیه سیتوکروم P450 ردوکتاز می‌باشد (ساختمان کریستالی دومن ردوکتازی nNOS در شکل ۱۹-۱۱ را با این ساختمان در سیتوکروم P450 ردوکتاز شکل ۴-۱۱ مقایسه کنید). این دو تقریباً ۶۰٪ هُمولوژی توالی مشترک دارند و معماری کلی و ساختمان‌های تحت‌دومنی، دومن FMN، دومن متصل‌کننده، و دومن اتصالی FAD/NADPH، بسیار شبیه یکدیگر هستند. تفاوت ساختمان اول بین این دو، وجود عناصر تنظیمی مختلفی است که در دومن ردوکتازی NOS وجود دارد که تنها به‌طورنسبی در ساختمان کریستالی ناشی از انعطاف‌پذیری فوق‌العاده قابل مشاهده می‌باشد.

همان‌طور که در شکل ۲۰-۱۱ نشان داده شده است، واکنش عمومی که توسط NOSها



شکل ۲۰-۱۱ تولید اکسید نیتریک. NOS ها تولید NO از L- آرژنین را از طریق دو مرحله منواکسیژناسیون متوالی کاتالیز می‌کنند که به نظر می‌رسد از نظر مکانیسم مشابه سیستم میکروزومی سیتوکروم P450 هستند. اتم نیتروژن (آبی) NO از گروه گوانیدینو زنجیر جانبی L- آرژنین، و اتم اکسیژن (قرمز) آن از اکسیژن ملکولی مشتق می‌شود.

کاتالیز می‌شود، منواکسیژناسیون متوالی اسید آمینه L- آرژنین در جهت تولید NO و سیترولین می‌باشد. چرخه واکنش با اتصال کالمودولین برای «بازنمودن دریچه» بین دومن‌های ردوکتازی و اکسیژنازی شروع می‌شود. دهنده الکترون NADPH است که دو الکترون به FAD می‌دهد که به‌نوبه خود FMN را احیاء می‌کند. FMN آهن هِم را به شکل فرو آن احیاء می‌کند که اکسیژن می‌تواند به آن اتصال یابد. در اولین مرحله، آرژنین به ترکیب واسط پایدار N- هیدروکسی L- آرژنین اکسیده می‌شود. در مرحله دوم، N- هیدروکسی L- آرژنین به NO و سیترولین اکسیده می‌شود. توجه داشته باشید که منبع NO گروه گوانیدینو سوبسترای آرژنین است. کل فرایند نیاز به دو ملکول اکسیژن و ۱٫۵ ملکول NADPH دارد و همانند فرایند مربوط به سیتوکروم‌های P450 توسط منواکسید کربن مهار می‌شود.

زنجیر انتقال الکترون و مکانیسم کلی که توسط آن NOSs تولید NO می‌کند، همانند حالت مربوط به سیتوکروم‌های P450 می‌باشد، ولی تفاوت‌های مهمی در تنظیم فرایند انتقال الکترون وجود دارد. واضح‌ترین تفاوت در نیاز NOsهای ذاتی به اتصال کالمودولین می‌باشد. در مقادیر کلسیم پایه داخل سلولی، کالمودولین به این آنزیم متصل نمی‌شود. برای این منظور نیاز به جریانی از کلسیم به داخل سلول جهت افزایش غلظت کلسیم می‌باشد که اتصال کلسیم به کالمودولین را افزایش می‌دهد (ص ۶۷۱). کمپلکس کلسیم- کالمودولین به NOSها اتصال یافته و آنها را فعال می‌کند. در غیاب اتصال کالمودولین، احیاء هِم بسیار آهسته می‌باشد که از تولید NO حمایت نمی‌کند و انتقال بین FAD و FMN نیز آهسته است. اتصال کالمودولین سبب یک تغییر کونفورماسیونی در آنزیم می‌شود که انتقال الکترون بین فلاوین‌ها را تقویت نموده و سبب احیاء مؤثر هِم می‌شود. دومن‌های ردوکتازی NOSs نیز حاوی چندین ناحیه تنظیمی است، در اشکال ۱۷-۱۱ و ۱۹-۱۱ نشان داده شده‌اند، که در تبدیل پیام اتصال کالمودولین از میان آنزیم نقش دارد. علاوه بر جایگاه اتصال به کالمودولین، نواحی تنظیمی موجود در NOSs شامل یک امتداد انتهای کربوکسیل دومن اتصالی FAD/NADPH، یک الحاق ۵۰-۴۵ ریشه‌ای موجود در دومن FMN، و یک الحاق کوچک در دومن متصل‌کننده می‌باشد. تمامی ایزوفرم‌های NOS حاوی انتهای آمینو هستند، ولی تنها اشکال دارای بیان ثابت حاوی الحاق‌های دومن متصل کننده FMN می‌باشند.

تفاوت دیگر بین NOSs و P450s این است که اتصال سوبسترا برای NOSها جهت

شروع چرخه واکنش لازم نمی‌باشد و اتصال سوبسترا تغییری در پتانسیل احیاء هِم بوجود نمی‌آورد. در صورت عدم وجود سوبسترا، الکترون انتقالی به هِم می‌تواند اکسیژن ملکولی را فعال نموده و تولید کمپلکس اکسی-فرو کند که می‌تواند از بین رفته و به صورت سوپر اکسید آزاد شود. در صورتی که الکترون دوم قبل از آزادسازی انتقال داده شود، تولید شکل پراکسی اکسیژن می‌شود که به صورت پراکسید هیدروژن جدا می‌گردد. لذا در غیاب سوبسترا، ولی با NOS فعال، احتمال تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن مخرب وجود دارد. به علاوه، یک کوفاکتور تتراهیدروبیوپترینی برای سنتز NO توسط NOS مورد نیاز است، ولی مورد نیاز هیچکدام از سیتوکروم‌های P450 شناخته‌شده نمی‌باشد. تتراهیدروبیوپترین به عنوان یک دهنده الکترون به کمپلکس اکسی-فرو (یعنی، شکلی از هِم که با یک الکترون احیاء شده است و متصل به اکسیژن می‌باشد) NOS عمل می‌کند که الکترون دوم را بسیار سریع‌تر از انتقال بین‌دومنی یک الکترون از NOS FMN، به هِم تحویل می‌دهد. لذا در غیاب تتراهیدروبیوپترین، NOS به دلیل اتواکسیداسیون کمپلکس اکسی-فرو، تولید سوپراکسید خواهد کرد. در حضور تتراهیدروبیوپترین، ولی در غیاب سوبسترا، NOS همچنین می‌تواند پراکسید هیدروژن تولید کند که به دلیل تولید و تجزیه بعدی کمپلکس پراکسی-فرو می‌باشد. تولید این گونه‌های احیاءشده اکسیژن در فرایندهای بیماری التهابی متعددی نظیر اختلال در عملکرد آندوتلیال، و همچنین در آسیب ایسکمی/برقراری مجدد جریان خون که طی آن بافت ابتدا از اکسیژن تخلیه می‌شود و سپس با خون غنی از اکسیژن دوباره تغذیه می‌شود، نقش دارد. این نوع آسیب در ترومبوز مغزی و در بافت‌هایی که برای پیوند برداشت شده‌اند، رخ می‌دهد.

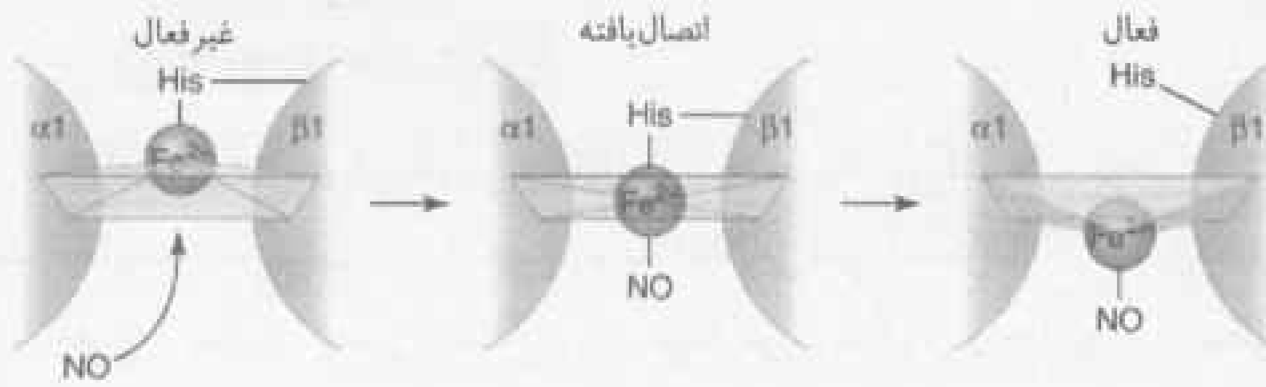
۸-۱۱ • ایزوفرم‌ها و فعالیت‌های فیزیولوژیکی اکسید نیتریک سنتاز

سه ایزوفرم اصلی NOS، شامل عصبی (NOSI یا nNOS)، قابل القاء (NOSII یا iNIS)، و آندوتلیالی (NOSIII یا eNOS) وجود دارد که مقادیر متفاوتی از آنها در بسیاری از بافت‌های مختلف یافت می‌شوند. خصوصیات این ایزوفرم‌ها در جدول ۴-۱۱ خلاصه شده است.

بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی NO از طریق فعال‌سازی گوانیلات سیکلاز محلول وساطت می‌گردد که یک پروتئین هترودیمری (α/β) حاوی هِم می‌باشد که GTP را به cGMP تبدیل می‌کند. cGMP پیامبر دومی است که در آبشارهای تبدیل پیام زیادی شرکت دارد (ص ۷۲۱). شکل غیرفعال گوانیلات سیکلاز یک هِم پنج-کوئوردینانسی دارد که به یک هیستیدین موجود در زیرواحد β اتصال دارد. NO به لیگاند ششم اتصال یافته و یک هِم شش-کوئوردینانسی به وجود می‌آورد و سبب شکستن پیوند هِم-هیستیدین می‌شود که نتیجه آن تولید کمپلکس پنج-کوئوردینانسی نیتروزیلی گوانیلات سیکلاز محلول می‌باشد (شکل ۲۱-۱۱). فعال‌سازی گوانیلات سیکلاز سبب افزایش تولید ۴۰۰ برابری cGMP می‌شود. مقادیر cGMP توسط تعادلی بین فعالیت گوانیلات سیکلازی و فسفودی‌استرازها

جدول ۴-۱۱ • خصوصیات ایزوفرم‌های NOS

خصوصیت	NOSI	NOSII	NOSIII
جرم ملکولی	۱۶۰ kD	۱۳۰ kD	۱۳۵ kD
بیان	ثابت	القایی	ثابت
جزء سلولی	سیتوپلاسمی	سیتوپلاسمی	متصل به غشاء
وابستگی به جریان کلسیم	وابسته	غیروابسته	وابسته
فعالیت فیزیولوژیک	انتقال پیام عصبی	سمیّت سلولی	اتساع عروقی



شکل ۲۱-۱۱ فعال‌سازی گوانیلات سیکلاز توسط NO.

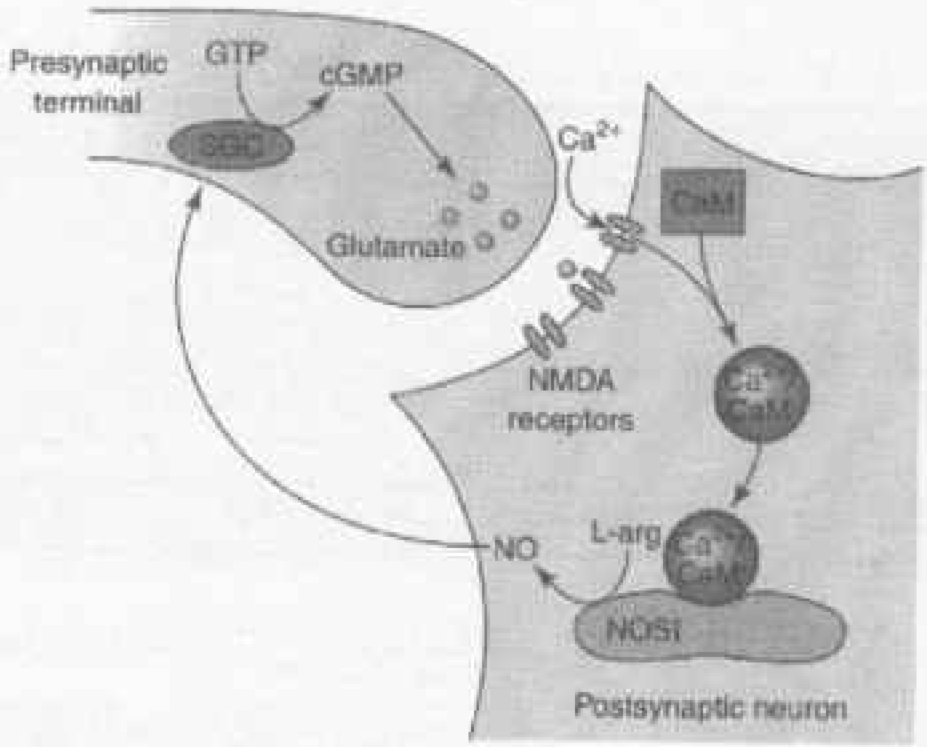
(PDE)، به‌خصوص PDE5 که برای cGMP اختصاصی است، تنظیم می‌شود؛ فسفودی استرازها با هیدرولیز cGMP به GMP – ′5 سبب خاتمه پیام می‌شود.

NOSI

NOSI اساساً در عضله اسکلتی و در نورون‌های هر دو سیستم عصبی مرکزی و محیطی وجود دارد. NOSI یک آنزیم محلول است، هر چند از طرق تعاملات پروتئین – پروتئین با مجموعه‌ای از پروتئین‌های تنظیمی و تمرکززایی[1]، در غشاء متمرکز می‌باشد. این آنزیم به‌طور ذاتی بیان می‌شود، یعنی به‌طور طبیعی در سطح رونویسی القاء نمی‌شود و توسط جریان کلسیم به‌داخل سلول فعال می‌گردد. در مورد NOSI (و NOSIII، ص ۶۱۰)، در مقادیر کلسیم پایه داخل سلولی، کالمودولین به آنزیم متصل نمی‌شود. برای اتصال کالمودولین به آنزیم و در نتیجه فعال‌سازی آنزیم نیاز به‌جریان کلسیم به داخل سلول و افزایش غلظت کلسیم داخل‌سلولی می‌باشد. میزان NO سنتزشده در حالت فعال بسیار کم و در حد پیکومولار است. NO تولیدی به عنوان نوروترانسمیتر در سیستم‌های عصبی محیطی و مرکزی عمل می‌کند. در عضله اسکلتی، NO همچنین به‌عنوان یک واسطه نیروی انقباضی عمل می‌کند.

در سیستم عصبی مرکزی، NO عموماً توسط nNOS در نورون پس‌سیناپسی تولید می‌شود، ولی در عرض سیناپس به سمت نورون پیش‌سیناپسی انتشار می‌یابد. سنتز NO توسط جریان به داخل کلسیم از طریق کانال‌های وابسته به گیرنده، یعنی به‌دنبال تحریک گیرنده‌های پس‌سیناپسی N–متیل –D–آسپارتات[2] (NMDA) توسط نوروترانسمیتر تحریکی گلوتامات، تنظیم می‌شود. گوانیلات سیکلاز توسط NO فعال شده و تولید cGMP می‌کند

1. Localization 2. *N*-Methyl-D-aspartate



شکل ۲۲-۱۱ تولید NO توسط NOSI در سیستم عصبی مرکزی. در این حالت، NO توسط سلول پس سیناپسی تولید می‌شود که به سلول پیش‌سیناپسی رفته و در آنجا با فعال‌سازی sGC سبب تولید cGMP و فعال‌سازی PKG می‌گردد. PKG پروتئین‌ها موجود بر روی وزیکول‌های نوروترانسمیتری را فسفریله نموده و منجر به آزادسازی نوروترانسمیتر بیشتر و تقویت پیام می‌شود.

که سنتز نوروترانسمیترهای نوراپی‌نفرین و گلوتامات را تحریک می‌کند و به موجب آن از طریق یک مکانیسم پس‌نوردی مثبت سبب تولید NO می‌شود (شکل ۲۲-۱۱). NO در پیام‌رسانی عصبی، سمّیت عصبی، شکل‌پذیری سیناپسی[1]، یادگیری و حافظه، و احساس درد نقش دارد.

علاوه‌بر دومن‌های اکسیژنازی و ردوکتازی، NOSI یک دومن ۳۰۰ اسید آمینه‌ای PDZ در انتهای آمینو دارد که تعامل آن با سایر پروتئین‌ها را وساطت می‌کند. در سیستم عصبی مرکزی، دومن PDZ از NOSI با پروتئین چگالی پس‌سیناپسی[2] PSD-95 تعامل می‌کند. گیرنده NMDA همچنین با PSD-95 تعامل می‌کند و بنابراین NOSI و گیرنده NMDA را در نزدیکی یکدیگر قرار می‌دهد تا NOSI مستقیماً در معرض کلسیمی قرار گیرد که وارد کانال یونی گیرنده فعال‌شده NMDA می‌شود.

NO بسیار متفاوت از سایر نوروترانسمیترهای شناخته‌شده (ص ۱۲۵۲) است و نمی‌تواند در وزیکول‌های لیپیدی ذخیره شود، زیرا به‌راحتی در عرض غشاء انتشار می‌یابد. عمل NO با تجزیه یا برداشت مجدد خاتمه پیدا نمی‌کند، بلکه از طریق تعامل با پروتئین هدف خود برداشت می‌گردد که یک پیامبر ثانویه دوم و نه یک گیرنده متصل به غشاء است.

در سیستم عصبی محیطی، NO توسط nNOS موجود در نورون‌های مزانتریک سیستم‌های گوارش، ریوی، عروقی، و ادراری-تناسلی تولید می‌شود. در سیستم گوارش، NO در حرکت روده و کنترل اسفنکتر پیلوری نقش دارد. NO مسیر اصلی اتساع برونش را در سیستم ریوی انسان وساطت می‌کند و در کنترل عصبی سیستم عروقی نقش دارد و به‌خصوص در جریان خون مغز مهم است. در سیستم اوروژنیتال، NO در کنترل مجرایی و مثانه‌ای و در نعوظ آلت تناسلی نقش دارد. در هنگام فعالیت جنسی، NO از اعصاب مجاور با عروق خونی آلت تناسلی آزاد می‌شود. با گشادشدن این عروق، خون در داخل جسم غاری[3] تجمع یافته و سبب نعوظ می‌شود. در این سیستم‌ها، NOSI با جریان رو به‌داخل کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ فعال می‌گردد (ص.۶۵۳). NO به

1. Synaptic plasticity
2. Postsynaptic density protein
3. Corpus cavernosum

ارتباط بالینی ۸-۱۱

مکانیسم عمل سیلدنافیل

میزان نوکلئوتیدهای حلقوی (cGMP و cAMP) موجود در سلول نه تنها به تولید آنها توسط گوانیلات یا آدنیلات سیکلازها، بلکه همچنین به تخریب آنها توسط فسفودی‌استرازها (PDEs) بستگی دارد که آنها را به '5- نوکلئوتیدها هیدرولیز می‌کنند و بنابراین نقش مهمی در تعدیل این پیامبرهای دوم در مسیرهای پیام‌رسانی بازی می‌کنند. لذا مهار تخریب نوکلئوتیدهای حلقوی توسط PDE سبب افزایش پاسخ فیزیولوژیکی می‌شود که توسط نوکلئوتیدهای حلقوی آغاز شده است. سیلدنافیل (ویاگرا) که در هنگام اختلال نعوظ در مردان تجویز می‌شود، یک مهارکننده قوی PDE5 است که برای cGMP اختصاصی است و اساساً در جسم غاری و در عضله صاف عروق و گوارشی یافت می‌شود. در آلت تناسلی، تولید نعوظ از طریق یک مسیر وابسته به cGMP صورت می‌گیرد که در متن مورد بحث قرار گرفته است. به دنبال تجزیه cGMP توسط PDE5، پیام اتساع عروقی ضعیف شده و نعوظ فروکش می‌کند. سیلدنافیل PDE5 را مهار نموده و سبب تأخیر در تجزیه cGMP و بنابراین طولانی‌شدن نعوظ می‌گردد.

سیلدنافیل شدیداً برای PDE5 نسبت به PDE3، یک PDE اختصاصی cAMP که در تنظیم انقباض قلب نقش دارد، انتخابی است. این موضوع مهم است، زیرا مهار PDE3 سبب افزایش میزان بروز آریتمی‌های قلبی و کاهش مرگ طولانی-مدت در مبتلایان به نارسایی قلبی می‌شود. جالب توجه است که سیلدنافیل همچنین، به میزان کمتر، سبب مهار PDE6 می‌شود که در گیرنده‌های نور شبکیه قرار دارد و یکی از اثرات جانبی که گاهی با مصرف سیلدنافیل گزارش می‌شود، یک ته‌رنگ آبی-سبز در دید بیمار می‌باشد.

از آنجایی‌که PDE5 در عضله صاف عروقی وجود دارد، سیلدنافیل منجر به کاهش خفیف فشار خون به دلیل اتساع عروقی می‌شود که اهمیت بالینی ندارد، ولی اثرات نیترات‌ها و دهنده‌های NO خارجی نظیر نیتروگلیسرین مصرفی برای آنژین را تشدید می‌کند که مهمتر بوده و گاهی منجر به کاهش فشار خون کشنده بالقوه می‌شود. این اثرات در کاهش فشار خون بدون توجه به توالی یا زمان مصرف دارو رخ می‌دهند. از اینرو، سیلدنافیل نباید در بیمارانی مصرف شود که هر شکلی از نیترات‌ها را مصرف می‌کنند. به‌علاوه، سیلدنافیل توسط هر دو مسیر CYP2C9 و 3A4 متابولیزه می‌شود. مهار این مسیرها توسط داروهای دیگر ممکن است سبب افزایش غلظت پلاسمایی سیلدنافیل و تشدید عوارض جانبی آن شود.

سلول عضلانی صاف مجاور انتشار یافته و گوانیلات سیکلاز محلول را فعال می‌کند. عضله صاف از طریق مکانیسمی که در ادامه برای عضله صاف عروقی شرح داده می‌شود، شل می‌گردد. ارتباط بالینی ۸-۱۱ تداخل درمانی در میزان cGMP را برای درمان اختلال عملکردی در هنگام نعوظ را شرح می‌دهد.

مقادیر بالای NOSI در عضله اسکلتی بیان می‌شود، محلی که در وساطت نیروی انقباضی، عصب‌دهی عضله در حال نمو، و احتمالاً برداشت گلوکز نقش دارد. شل‌شدن عضله اسکلتی توسط NO همچنین از طریق مسیر cGMP به‌واسطه مکانیسمی رخ می‌دهد که در ادامه برای عضله صاف عروقی شرح داده می‌شود. NOSI به واسطه پیوستن به α-سینتروفین، عضوی از کمپلکس دیستروفین عضله، به سارکولم عضله هدفمند می‌شود. NOSI توسط جریان رو به داخل کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، و همچنین از شبکه سارکوپلاسمی، فعال می‌گردد.

NOSII

NOSII اساساً در نوتروفیل‌ها و ماکروفاژهای فعال‌شده، آستروسیت‌ها و هپاتوسیت‌ها یافت شده و در پاسخ ایمنی زودرس نقش دارد. NOSII یک آنزیم محلول است و در سطح

رونویسی توسط سیتوکین‌هایی نظیر اینترفرون γ، اینترلوکین ۱ و فاکتور نکروز تومور α یا آندوتوکسین‌ها، فعال می‌گردد. القاء طی چند ساعت از طریق مسیر NFκB التهابی رخ می‌دهد. تحت شرایط فیزیولوژیکی پایه، یعنی مستقل از جریان به‌داخل کلسیم، کالمودولین به NOSII اتصال می‌یابد، لذا این آنزیم هر وقت که سنتز شد همیشه فعال است. میزان NO تولیدی توسط NOSII در دامنه نانومولار قرار دارد که تقریباً ۱۰۰۰ برابر میزان مربوط به NOSI یا NOSIII می‌باشد.

NO تولیدی توسط NOSII یک سیتوتوکسین قوی است و نقش اصلی آن در جهت تخریب عوامل بیماریزایی می‌باشد که توسط نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها بلعیده شده‌اند. NOSII عوامل بیماریزای داخل‌سلولی نظیر انگل‌ها، برای مثال پلاسمودیوم (مالاریا)، شیستوزوما (شیستوزومیازیس)، لیشمانیا (لیشمانیازیس)، و توکسوپلاسما (توکسوپلاسموزیس)، و همچنین میکروب‌هایی نظیر باکتری‌ها و مایکوباکتری‌ها (سل و جذام)، قارچ‌ها، و حتی سلول‌های توموری را از بین می‌برد. اهداف سلولی NO تولیدی توسط NOSII شامل پروتئین‌های هِمی حاوی فلز، نظیر سیتوکروم‌های P450، و پروتئین‌های آن-گوگرد نظیر اکونیتاز و کمپلکس‌های I و II میتوکندریایی می‌باشند که همگی مهار می‌شوند. NO همچنین با اکسیژن یا سوپراکسید تولید ترکیبات اکسید نیتروژنی شدیداً واکنشگر، برای مثال پراکسی نیتریت، می‌کنند. این ترکیبات واکنشگر سبب انواع مختلفی از تغییرات DNA شامل شکست زنجیر و دآمیناسیون می‌شوند. لذا این تغییرات بر بسیاری از آنزیم‌های متابولیکی مهم اثر گذاشته و سبب ایجاد اثرات سیتوستاتیک یا سیتوتوکسیک در برابر این عوامل بیماریزا می‌گردند.

با وجود اینکه NO برای عملکرد ضدمیکروبی ماکروفاژ ضروری است، تولید بیش از حد NO توسط NOSII در شوک گردش خون به‌واسط سپسیس یا سیتوکین نقش دارد. شوک سپتیک با یک پاسخ التهابی به عفونت میکروبی مشخص می‌شود که در آن فشارخون به میزان زیادی کاهش می‌یابد که حاصل تولید بیش از حد NO است که خود همراه با کاهش خونرسانی و تحویل اکسیژن به بافت می‌باشد که نهایتاً منجر به نارسایی چندین عضو می‌شود. کاهش فشار خون در این بیماران اغلب نسبت به داروهای متداول منقبض‌کننده عروق سرکش می‌باشد. نقش NO در شوک سپتیک و تداخل درمانی توسط مهارکننده‌های NOS در ارتباط بالینی ۹-۱۱ مورد بحث قرار گرفته است.

علاوه‌بر تولید در هنگام التهاب حاد، NO توسط NOSII در هنگام التهاب مزمن تولید می‌شود. در برخی حالات التهابی مزمن شامل آرتریت روماتوئید، بیماری کرون، و آسم، NOSII وجود دارد و فعال است؛ در این حالات NO ممکن است سبب تشدید برخی مسائل شود، ولی اثرات حفاظتی آن نیز گزارش شده است.

NOSIII

NOSIII اساساً در سلول‌های آندوتلیال عروقی که دیواره تمامی عروق را می‌پوشانند، و در میوسیت‌های قلبی یافت می‌شود. این آنزیم به‌دلیل میریستیلاسیون همزمان با ترجمه و

ارتباط بالینی ۹-۱۱

تولید بیش از حد اکسید نیتریک در شوک سپتیک

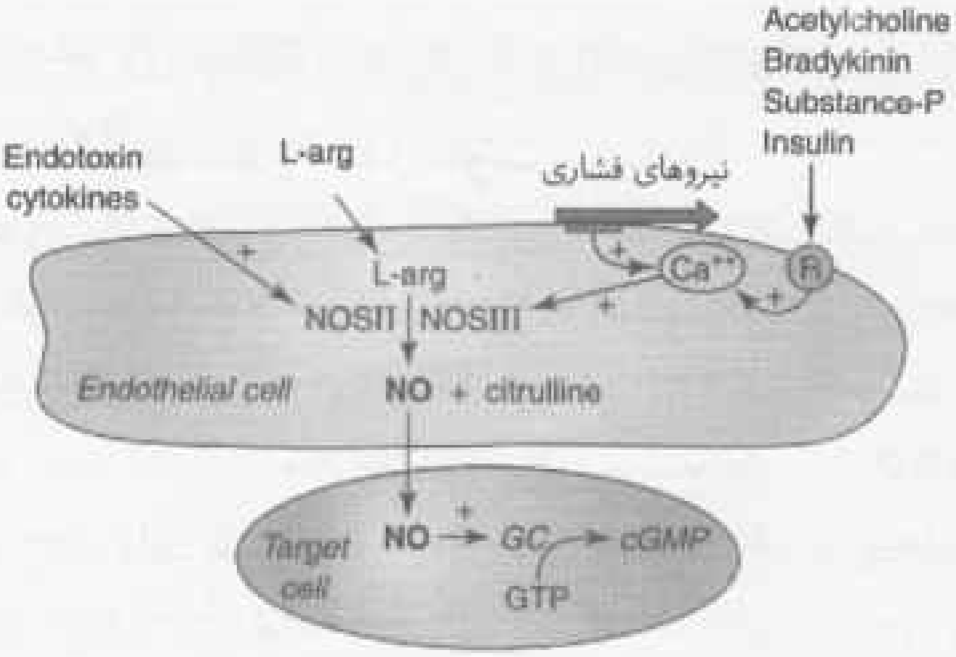
با وجود اینکه NO برای فعالیت‌های تومورکشی و باکتری‌کشی ماکروفاژها ضروری است، تولید بیش از حد NO (توسط NOSII) در شوک گردش خون به‌واسطه سپسیس یا سیتوکین در انسان همکاری دارد. در شوک سپتیک، تولید مقادیر بسیار زیاد NO منجر به اتساع عروقی سیستماتیک وسیع و یک کاهش بسیار شدید و اغلب کشنده فشار خون می‌شود که نتیجه آن تأمین ناکافی خون و اکسیژن برای اعضاء محیطی و نهایتاً نارسایی چندین عضو می‌باشد. شوک سپتیک با مرگ و میر فوق‌العاده بالایی در حدود ۵۰٪ تا ۷۰٪ همراه می‌باشد؛ تعداد افرادی که سالانه در اثر شوک سپتیک فوت می‌کنند، بیش از مرگ ناشی از آنفارکتوس میوکارد، سکته، تروما، سرطان ریه یا پستان می‌باشد. کاهش فشار خون ناشی از NO در این بیماران از طریق مکانیسم شل شدن عضله صاف یعنی فعال‌سازی گوانیلات سیکلاز، صاف رخ می‌دهد. تداخل درمانی توسط مهارکننده‌های NOS برای درمان شوک سپتیک مورد بررسی قرار گرفته است. جالب توجه است که با وجود اینکه مهار NOS به‌شکل موفقیت‌آمیز و سریعی فشار خون و مقاومت عروق سیستمیک را افزایش می‌دهد، ولی منجر به کاهش پیشرونده در برون‌ده قلبی و اختلال اغراق‌آمیز در عملکرد بافتی می‌شود که نتیجه آن افزایش مرگ و میر در کارآزمایی‌های بالینی است. لذا NO یک نقش تعیین‌کننده در شوک سپتیک، به‌واسطه کاهش فشار خون، دارد ولی ممکن است همچنین نقش مفیدی در افزایش بقاء داشته باشد که خود احتمالاً از طریق اتساع‌عروقی موضعی یا خصوصیات ضدتجمع پلاکتی، ضدچسبندگی لکوسیتی، ضدآپوپتوز یا ضداکسیدان NO است.

پالیمیتیلاسیون بعد از ترجمه انتهای آمینو، در غشاء متمرکز می‌باشد. همانند NOSI، این آنزیم به‌طور ذاتی بیان شده و توسط جریان رو به داخل کلسیم که از طریق اتصال به کالمودولین سبب تسهیل اتصال آن به NOSI و NOSIII می‌شود، فعال می‌گردد. میزان سنتز NO در حالت فعال‌شده بسیار کم، در حد پیکومولار، است و NO تولیدی به‌عنوان یک متسع‌کننده عضله صاف عروقی، هم به‌واسطه لیگاند و هم وابسته به جریان، عمل می‌کند. NO همچنین از طریق مهار اتصال و تجمع پلاکتی و لکوسیتی، به‌عنوان یک عامل ضدترومبوز و ضدالتهاب عمل می‌کند. به‌علاوه، NO آنژیوتانسین II را مهار می‌کند که خود یک منقبض‌کننده عروقی است.

سنتز NO توسط NOSIII در پاسخ به افزایش کلسیم حاصل از اتصال لیگاندهایی نظیر استیل‌کولین، برادی‌کینین، هیستامین یا انسولین، یا به دنبال استرس فشاری[1]، نیروی مکانیکی جریان خون بر روی سطح مجرایی آندوتلیوم عروقی، فعال می‌شود. لذا افزایش سرعت جریان خون آزادسازی کلسیم را تحریک می‌کند که از طریق افزایش فعالیت NOSIII منجر به اتساع عروقی می‌گردد.

NO به خارج سلول آندوتلیال و به‌داخل سلول‌های عضلانی مجاور انتشار یافته و در آنجا به گوانیلات سیکلاز محلول اتصال می‌یابد و با فعال‌سازی آن تولید cGMP می‌کند (شکل ۲۳-۱۱). cGMP پروتئین کیناز G را فعال می‌کند که یک کیناز وابسته به cGMP است و انواع مختلفی از کانال‌ها، شامل کانال‌های کلسیمی نوع L، و گیرنده‌ها را فسفریله می‌کند که همگی منجر به مهار جریان کلسیم به داخل سلول عضلانی می‌گردند. انقباض

1. shear stress



شکل ۲۳-۱۱ **NO تولیدی توسط NOSIII در سلول آندوتلیال.** غلظت کلسیم موجود در سلول آندوتلیال به‌دلیل اتصال لیگاند یا استرس فشاری افزایش یافته تا سبب فعال‌سازی تولید NO توسط NOSIII شود. NO در عرض غشاء سلول آندوتلیال به داخل یک سلول عضله صاف انتشار یافته و در آنجا sGC را فعال می‌کند.

عروقی در عضله صاف عروقی نیاز به جریان کلسیم دارد که به کالمودولین اتصال یافته و به‌نوبه‌خود کیناز زنجیر سبک عضله [1] (MLCK) را فعال می‌سازد. سپس MLCK زنجیر سبک میوزین [2] (MLC) را فسفریله می‌کند تا سبب ایجاد اتصال عرضی بین سرهای میوزین و فیلمان اکتین شود که نتیجه آن انقباض است (ص ۱۳۰۰). مهار جریان کلسیم به داخل سلول سبب کاهش تحریک MLCK به‌واسط کالمودولین شده که با کاهش فسفریلاسیون MLC، کشش عضله صاف را کاهش داده و بدین‌ترتیب منجر به اتساع عروق می‌شود. افزایش cGMP همچنین مستقیماً با فعال‌سازی MLC فسفاتاز سبب دفسفریلاسیون MLC می‌شود. همانند NOSI، میزان cGMP توسط تعادل بین فعالیت گوانیلات سیکلازی و فسفودی‌استرازها تنظیم می‌شود؛ آنزیم‌های اخیر cGMP را به ′5 – GMP هیدرولیز نموده و بنابراین فعالیت پروتئین کیناز G و اتساع عروقی را خاموش می‌کنند. چندین درمان براساس تجویز NO، به صورت مستقیم یا به شکل پیش‌ساز، وجود دارد. ارتباط بالینی ۱۰-۱۱ به سابقه استفاده از نیتروگلیسرین در اتساع عروقی و ارتباط بالینی ۱۱-۱۱ به استفاده مستقیم از NO به عنوان یک روش درمانی پرداخته است.

NOSIII یک توالی بی‌همتا در انتهای آمینو دارد که با میریستیلاسیون در یک محل و پالمیتیلاسیون در دو محل دیگر این توالی، آنزیم را در غشاء متمرکز می‌کند که در آنجا به پلاسمالمای غارها هدایت می‌شود. غارها تورفتگی‌های کوچکی از غشاء پلاسمایی است که با وجود پروتئین‌هایی به‌نام کاوئولین [3] مشخص می‌شود که در جهت سازماندهی و اتصال ملکول‌های پیام‌رسانی نظیر گیرنده‌ها، پروتئین‌های G، و NOS به غشاء پلاسمایی عمل می‌کنند. در غلظت‌های پایین کلسیم سیتوپلاسمی، کاوئولین-۱ به NOSIII اتصال یافته و آن را در یک وضعیت غیرفعال نگه می‌دارد. با جریان رو به داخل کلسیم، کالمودولین به‌طور رقابتی جایگزین کاوئولین از NOSIII می‌شود که نتیجه آن فعال‌سازی سنتز NOS می‌باشد.

چندین پروتئین دیگر نیز در غارها متمرکز می‌باشند که برای فعالیت NOSIII لازم

1. Muscle light chain kinase 2. Myosin light chain 3. Caveolin

ارتباط بالینی ۱۰-۱۱

تاریخچه و اثرات بیولوژیکی نیتروگلیسرین

نیتروگلیسرین که گلیسریل تری‌نیترات[1] (GTN) نام بهتری برای آن است، ابتدا در سال ۱۸۴۶ توسط آسکانیو سوبرور[2] سنتز شد. از آنجایی‌که GTN قابلیت انفجار بالایی داشت و حوادث کشنده زیادی رخ داده بود، آلفرد نوبل[3] روشی را در سال ۱۸۶۴ برای تثبیت GTN از طریق اختلاط آن با خاک جلبکی[4] ابداع کرد.

دارایی که وی از دینامیت به‌دست آورد، اساس جایزه نوبل است که در هر سال در سوئد برای کارهای برجسته در زمینه‌های فیزیک، شیمی، فیزیولوژی یا پزشکی، ادبیات، اقتصاد و صلح جهانی اعطاء می‌شود. مدت کوتاهی بعد از آن، در سال ۱۸۶۷، سر توماس لادر برونتون[5] برای اولین بار استفاده از آمیل نیترات استنشاقی را در بیماران خود گزارش نمود که مبتلا به درد قفسه سینه بودند و در سال، ۱۸۷۹ ویلیام مورل[6] مقاله‌ای را در توصیف استفاده از ترکیب طولانی‌اثرتر و مناسب‌تر GTN برای تسکین بهتر درد آنژین صدری منتشر نمود. GTN از طریق اتساع شریان‌های قلب و به‌دنبال آن اکسیژناسیون بهتر این بافت عمل می‌کند. مورل در سال ۱۹۱۲ به دلیل نارسایی قلبی درمان‌نشده فوت نمود و هرگز GTN را مصرف نکرد، و وقتی پزشک GTN را جهت بیماری قلبی برای نوبل تجویز نمود، از مصرف آن خودداری نمود.

تا سال ۱۹۸۷، یک قرن بعد از انتشار مورل، هنوز مطرح نشده بود که اکسید نیتریک آزادشده از متابولیسم GTN عامل فعال در اتساع عروق خونی کرونری است. تا ۱۵ سال بعد بود که مکانیسم آزادسازی اکسید نیتریک از نیتروگلیسرین شرح داده شد. آلدئید دهیدروژناز میتوکندریایی (ALDH2) GTN را به ۲،۱-گلیسرول دی‌نیتریت و نیتریت متابولیزه می‌کند. این نیتریت به NO احیاء می‌گردد. مکانیسم این احیاء نامشخص است، ولی ALDH2 ممکن است در این مرحله نقش داشته باشد و همچنین نشان داده شده است اعضایی از زنجیر انتقال الکترون میتوکندریایی نیتریت را به NO احیاء می‌کنند. به طریق دیگر، یک مکانیسم اصلی احیاء نیتریت ممکن است از طریق واکنش مستقیم با هموگلوبین یا میوگلوبین داکسیژنه باشد.

با مصرف GTN طی دوره‌های طولانی برای شرایط مزمن، این عامل بتدریج کارایی خود را از دست می‌دهد. مکانیسم‌های متعددی برای تحمل بیمار نسبت به این دارو مطرح شده است. دو مکانیسم احتمالی شامل اختلال در تغییر بیولوژیکی GTN توسط ALDH2 که به‌دنبال کاهش یک احیاءکننده ALDH2 رخ می‌دهد، و افزایش در استرس اکسیداتیو به دلیل اختلال در متابولیسم میتوکندریایی می‌باشند.

1. Glyceryl trinitrate 2. Ascanio Sobreror 3. Alfred Nobel
4. Diatomaceous earth 5. Sir Thomas Lauder Brunton
6. William Murrell

هستند. انتقال‌دهنده اسید آمینه کاتیونی CAT-1 که در داخل غارها قرار دارد، در برداشت *L*-آرژینین و بنابراین تضمین تأمین سوبسترا برای سنتز NO همکاری می‌کند. NOSIII با پورین، یک کانال آنیونی/کاتیونی وابسته به ولتاژ، در تعامل است که NOSIII را در نزدیک منبع جریان کلسیم به داخل متمرکز می‌کند. گیرنده برادی‌کینین B2 نیز وجود دارد و به NOSIII اتصال یافته و آن را فعال می‌سازد. به‌دنبال تحریک توسط برادی‌کینین، این کمپلکس جدا شده و NOSIII فعال می‌شود. تمرکززایی در غارها یک تنظیم‌کننده مهم فعالیت NOS است؛ در صورت مهار پالمیتیلاسیون، NOSIII در غارها یافت نمی‌شود و سنتز NO در آن سلول‌ها رخ نمی‌دهد. پالمیتیلاسیون یک فرایند برگشت‌پذیر است که تحت تأثیر برخی آگونیست‌ها قرار می‌گیرد و برای تمرکززایی غشایی ضروری است؛ احتمال دارد تمرکززایی مجدد سلولی که منجر به غیرفعال‌سازی می‌شود، به‌دنبال دپالمیتیلاسیون رخ دهد.

بسیاری از فرایندهای مرتبط با بیماری‌ها، نظیر فشار خون بالا، هیپرکلسترولمی و

ارتباط بالینی ۱۱-۱۱

کاربردهای درمانی اکسید نیتریک استنشاقی

اکسید نیتریکی که به شکل سیستماتیک تحویل داده می‌شود، منجر به کاهش فشار خون سیستمیک می‌شود که فایده آن به عنوان یک عامل درمانی را شدیداً محدود می‌کند. از طرف دیگر، اکسید نیتریکی که استنشاق شده است، از نظر تئوری منجر به شلی عضلات تنفسی می‌شود، ولی هر NO اضافی که به گردش خون می‌رسد، توسط اکسی-هموگلوبین برداشت خواهد شد و به موجب آن مانع اتساع عروقی سیستمیک می‌گردد. در حقیقت، مطالعات نشان داده‌اند که استنشاق NO اکسیژناسیون سیستمیک نوزادان هیپوکسمیک مبتلا به فشار خون بالای ریوی پایدار نوزادان[1] (PPHN) را افزایش می‌دهد. NO استنشاقی همچنین میزان بروز و مرگ و میر دیس پلازی برونکوپولمونری (BPD) را در اطفال نارس کاهش داد. در بالغین، بیماری انسدادی ریه (COPD) به شکل موفقیت‌آمیزی با ترکیبی از اکسیژنی مکمل NO درمان شده است؛ چنینی درمانی سبب کاهش فشار خون شریان ریوی و مقاومت عروق ریوی و همچنین افزایش برون‌ده قلبی در بیماران درمان شده شد.

هرچند، بسیاری از بیماران به درمان با NO استنشاقی پاسخ نمی‌دهند. به علاوه، اثرات NO زودگذر بوده و با قطع درمان ناپدید می‌شود، لذا نیاز به درمان مداوم می‌باشد. حدود ۷۰٪ از NO استنشاقی ظرف ۴۸ ساعت به شکل نیترات از طریق ادرار دفع می‌شود. چندین مطالعه نشان داده‌اند که استفاده از سیلدنافیل، داروی مورد استفاده در درمان اختلالات نعوظ، سبب تشدید یا افزایش مدت اثرات NO استنشاقی در اتساع عروق می‌شود. همان‌طور که در ارتباط بالینی ۸-۱۱ مورد بحث قرار گرفته است، سیلدنافیل مانع تجزیه cGMP از طریق مهار فسفودی‌استراز اختصاصی cGMP، یعنی PDE5، می‌شود که ایزوفرمی است که شدیداً در آلت تناسلی، شبکیه و بافت ریه بیان می‌شود. در مبتلایان به فشارخون بالای ریوی، اتساع عروقی ناشی از NO استنشاقی سبب تشدید و تداوم درمان همزمان با سیلدنافیل شد.

با وجود اینکه NO استنشاقی اثری بر فشار خون سیستماتیک ندارد، اثرات سیستمیک دیگر شامل مهار پلاکتی و لکوسیتی که منجر به کاهش ترومبوز و آسیب ایسکمی/برقراری مجدد جریان می‌شود، گزارش شده است. معتقدند که این اثرات سیستمیک به‌واسطه تیول‌های دارای وزن ملکولی پایین و بالا انتقالی توسط خون می‌باشند که با NO واکنش نموده و آن را به شکل پایدار در سرتاسر بدن انتقال می‌دهند. آلبومین سرم، هموگلوبین S-نیتروزیله و همچنین سایر نیتروزآمین‌ها، آهن-نیتروزیل‌ها، و لیپیدهای نیتراته، مدیاتورهای احتمالی هستند.

1. Persistant pulmonary hypertension of the newborn

دیابت منجر به اختلال در عملکرد آندوتلیال می‌شوند که با به‌مخاطره افتادن فعالیت‌های طبیعی سلول‌های آندوتلیال، شامل اتساع عروقی و وساطت چسبندگی پلاکتی، مشخص می‌شوند. یکی از مشخصه‌های اصلی اختلال در عملکرد غشاء، کاهش دسترسی زیستی به NO به دلیل کاهش فعالیت NOSIII می‌باشد. ارتباط بالینی ۱۲-۱۱ به برخی نقش‌های احتمالی NO در مکانیسم‌های مرتبط با اختلال در عملکرد آندوتلیوم اشاره دارد.

تمامی NOSها تولید NO می‌کنند که فعالیت‌های متنوعی را به عنوان نوروترانسمیتر، متسع‌کننده عروقی، شل‌کننده عضلانی، و عامل سمّیت سلولی دارد. نتایج حاصل از عملکرد NO می‌تواند در مواردی نظیر حفظ تون عروقی، کسب حافظه و یادگیری، و حفاظت در برابر تهاجم عوامل بیماریزا مفید و در موارد دیگری نظیر شوک سپتیک یا پاسخ‌های التهابی و جهش‌زا مضر باشند. اثر خالص NO تولیدی بستگی به محل تولید آن، نحوه تنظیم تولید آن، میزان تولید آن و وجود سایر گونه‌های واکنشگر دارد.

ارتباط بالینی ۱۲-۱۱

نقش eNOS در اختلال عملکرد آندوتلیال

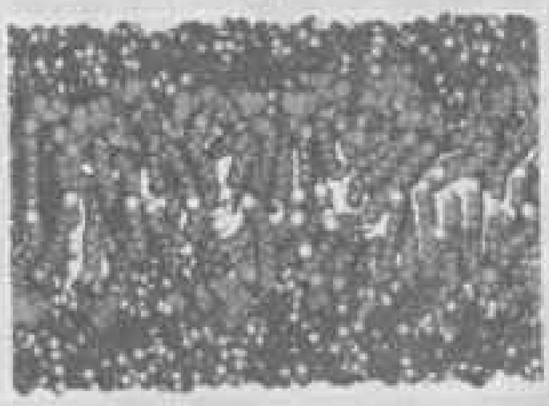
اکسید نیتریک مشتق از eNOS درسلول‌های آندوتلیال عروقی مسئول تنظیم تون عروقی، مهار تجمع و چسبندگی پلاکتی و لکوسیتی، کاهش بیان ژن‌های پیش‌التهابی، و محدودیت ازدیاد سلول عضله صاف عروقی می‌باشد. اختلال در فعالیت آندوتلیال با کاهش سنتز NO مشخص می‌شود که همراه با افزایش اسپاسم عروقی، التهاب عروقی، و ترومبوز می‌باشد که خود در بسیاری از موارد همزمان با سایر عوامل خطر قلبی - عروقی نظیر دیابت، فشار خون بالا، آترواسکلروز یا هیپرکلسترولمی مشاهده می‌گردد. معتقدند که استرس اکسیداتیو عروقی ناشی از افزایش تولید گونه‌های رادیکال اکسیژن، به‌خصوص سوپراکسید، با اختلال در عملکرد آندوتلیال ارتباط دارد که تا حدودی به‌دلیل واکنش سوپراکسید با NO در جهت تولید پراکسی‌نیتریت می‌باشد. نه تنها NO کمی برای انجام فعالیت‌های بیولوژیکی حفاظتی آن در دسترس قرار دارد، پراکسی‌نیتریت نیز یک عامل اکسیدان و نیتراته‌کننده قوی است که به ملکول‌های پروتئین، DNA، و لیپید آسیب می‌رساند. اغلب از نیتراسیون کووالان ریشه‌های تیروزین موجود در پروتئین‌ها توسط گونه‌های واکنشگر اکسیژن، به عنوان یک نشانگر استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود. پراکسی‌نیتریت همچنین مسئول تخلیه تتراهیدروبیوپترین است که منجر به جداشدن انتقال الکترون eNOS شده که خود سبب می‌شود تا eNOS بیشتر تولید سوپراکسید کند تا اکسید نیتریک و این سبب تشدید استرس اکسیداتیو می‌گردد. در غیاب NO و در حضور استرس اکسیداتیو، چندین مسیر پیش‌التهابی و پیش‌آترواسکلروتیک فعال می‌شوند؛ این اساس ملکولی اولیه اختلال در عملکرد آندوتلیال است.

درمان با داروهای ضداکسیدان، نظیر ویتامین C یا E، سبب حفظ مقادیر NO با قابلیت فراهم‌زیستی نشده و سبب بهبود وضعیت قلبی - عروقی نیز نمی‌شود که احتمالاً دلیل آن این است که این ویتامین‌ها سوپراکسید را قبل از واکنش با NO، برداشت نمی‌کنند. یکی از مؤثرترین کلاس‌های دارویی شامل استاتین‌ها است که هم از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و هم از طریق مهار فعالیت NADPH اکسیداز، یک منبع برجسته تولید سوپراکسید، و همچنین به‌واسطه افزایش تولید NO توسط eNOS، از طریق هم بیان پروتئین و هم فسفریلاسیون، عمل می‌کند. مهارکننده‌های آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) و آگونیست‌های گیرنده آنژیوتانسین II نیز به شکل مؤثری عاقبت قلبی - عروقی را بهبود می‌بخشند. این داروها سبب کاهش تولید با عمل آنژیوتانسین II می‌شوند، پروتئینی[1] که NADPH اکسیدازها را فعال نموده و بنابراین استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد.

۱. آنژیوتانسین II با هشت اسید آمینه، یک اولیگوپپتید است و پروتئین نمی‌باشد. مترجم.



۱۲



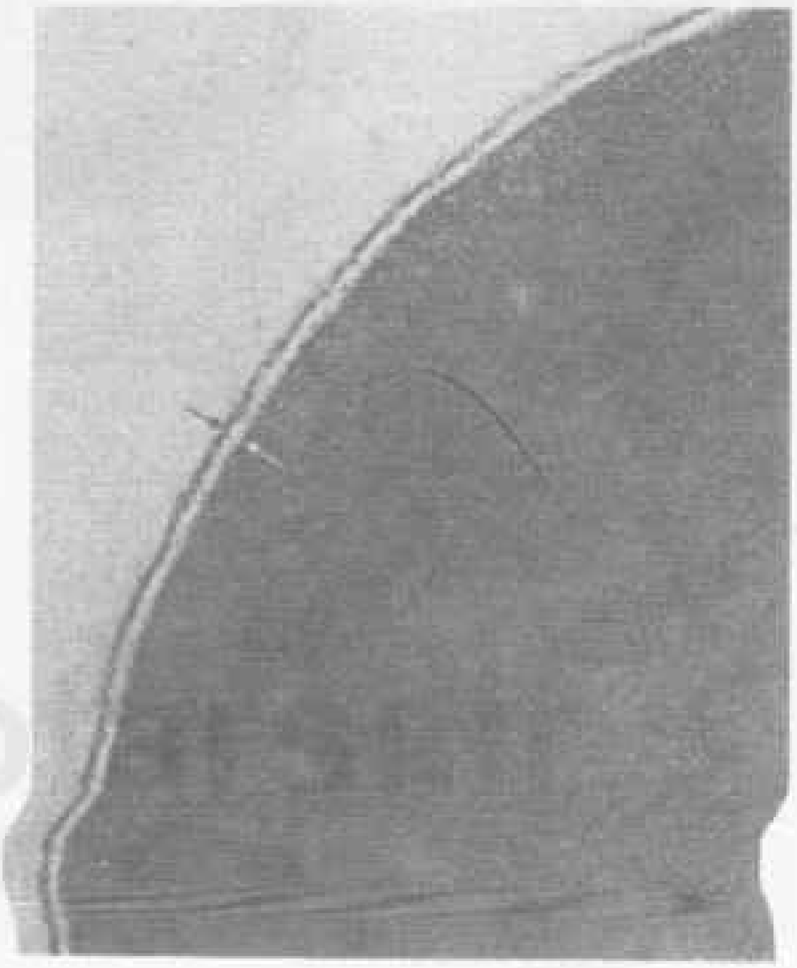
غشاءهای بیولوژیک: ساختمان، گیرنده‌ها و انتقال مواد

مفاهیم کلیدی

- لیپیدهای اصلی غشاءهای بیولوژیکی شامل گلیسروفسفولیپیدها، اسفنگو-لیپیدها و کلسترول می‌باشند. ترکیب لیپیدی اختصاصی برحسب منبع غشاء متفاوت است.
- در محیط آبی، لیپیدهای آمفی‌پاتیک می‌توانند ساختمان‌های کروی (میسل‌ها) و وزیکول‌ها (لیپوزوم‌ها) را به وجود آورند که حاوی غشایی متشکل از یک دولایه لیپیدها با انتشار تصادفی می‌باشند. گروه‌های قطبی در تماس با محیط آبی قرار دارند. غشاءهای بیولوژیکی ساختمان مشابهی دارند.
- پروتئین‌های غشایی به‌صورت داخلی (با اتصال محکم) و محیطی (به‌راحتی جدا می‌شوند) طبقه‌بندی می‌شوند. پروتئین‌های داخلی یک قطعه یا چندین دومن پل‌زننده بر روی دولایه غشاء دارند. برخی از اینها ساختمان‌های هُمو- یا هترو- اولیگومری ایجاد می‌کنند. پروتئین‌های محیطی وسایل مختلفی برای اتصال به سطح دولایه دارند. ترکیب پروتئینی وابسته به عملکرد غشاء است.
- لیپیدها و پروتئین‌ها به‌راحتی در داخل غشاء انتشار جانبی، ولی نه عرضی،

دارند. غشاءهای بیولوژیکی یک عدم‌تقارن شیمیایی دارند. ریزدومن‌های لیپید-پروتئین با فعالیت‌های اختصاصی وجود دارند.

- گیرنده‌های پروتئین غشایی با فاکتورهای رشد، هورمون‌ها، و سایر ملکول‌های کوچک تعامل می‌کنند که آغازگر یک پاسخ سلولی هستند. برخی گیرنده‌ها از انواع کانال‌های یونی هستند، در حالی که بقیه واکنش‌های آنزیمی یا تعاملات پروتئین- پروتئین داخل‌سلولی را آغاز می‌کنند.
- ساختمان‌های پروتئینی اختصاصی موجود در غشاء جابه‌جایی یون‌ها و ترکیبات غیرقابل‌انتشار را در عرض غشاء تسهیل می‌کنند. این پروتئین‌ها به عنوان کانال / منفذ و یا انتقال‌دهنده طبقه‌بندی می‌شوند. انتقال‌دهنده‌ها جابه‌جایی را بدون دریافت انرژی متابولیکی تسهیل می‌کنند. بقیه نیاز به انرژی حاصل از هیدرولیز ATP یا یک شیب $[Na^+]$ یا $[H^+]$ برای جابه‌جایی سوبسترا دارند. برخی سموم در غشاءها منافذی را به وجود می‌آورند. یونوفورها حرکت یون‌ها در عرض غشاءها را تسهیل می‌کنند.



شکل ۱-۱۲ **میکروگراف الکترونی غشاء پلاسمایی گلبول قرمز که ظاهر سه‌لایه را نشان می‌دهد.** یک فضای مشخص دو خط الکترونی- متراکم را جدا کرده است. میکروسکوپی الکترونی نشان داده است که خط متراکم داخلی اغلب ضخیم‌تر از خط خارجی است. بزرگنمایی حدود ۱۵۰,۰۰۰ برابر.

۱-۱۲ • مقدمه

غشاءهای مربوط به سلول‌های اوکاریوتی و پروکاریوتی اجزاء شیمیایی یکسانی دارند، از نظر سازماندهی مشابه هستند و خصوصیات مشترک زیادی دارند. وقتی با میکروسکوپ الکترونی به این غشاءها نگاه می‌شود، یک ظاهر سه‌لایه دارند (شکل ۱-۱۲) که در آن دو باند تیره در دو سمت یک باند روشن مشاهده می‌گردد. عرض اکثر غشاءهای پستانداران ۷ تا ۱۰ nm است و لایه متراکم داخلی اغلب ضخیم‌تر از لایه متراکم خارجی است. غشاءهای داخل سلولی معمولاً نازکتر از غشاءهای پلاسمایی هستند. غشاءها یک عدم تقارن شیمیایی دارند و سطوح آنها به‌واسطه وجود پروتئین‌های کروی امتدادیافته از غشاء، نقطه‌نقطه می‌باشد. غشاءها ساختمان‌های پویایی هستند که به سلول‌ها این امکان را می‌دهند تا شکل خود را تنظیم نموده و موقعیت خود را تغییر دهند. این لیپیدها حالت مایعی دارد که در داخل آن پروتئین‌ها و لیپیدها قادر به انتشار و تعامل هستند.

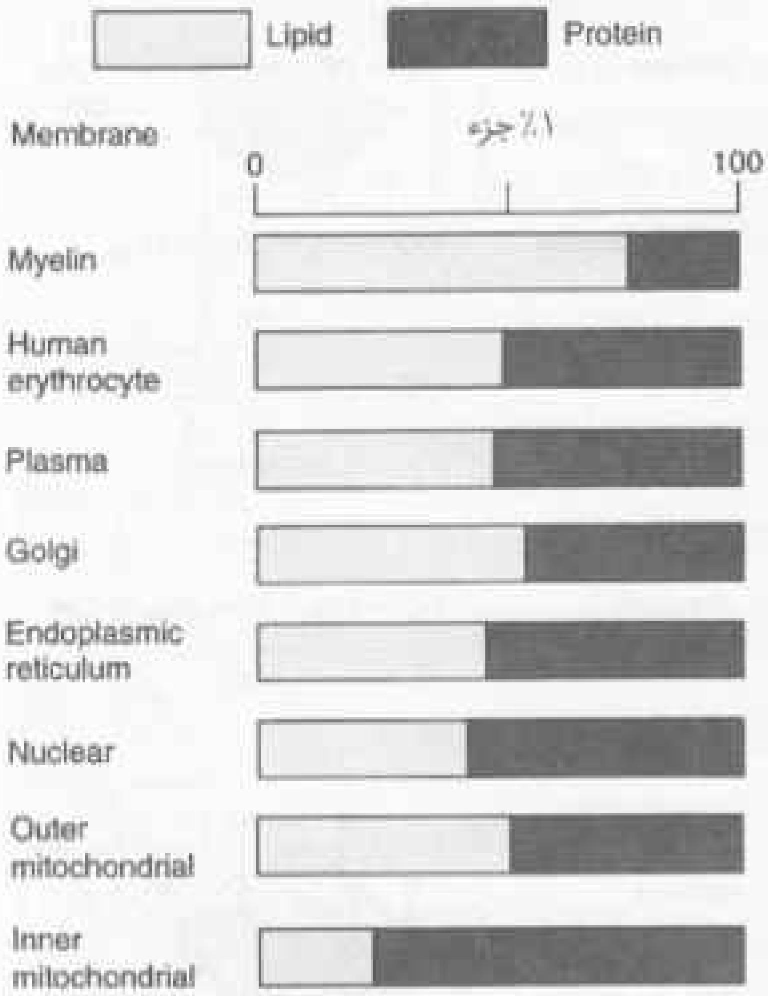
غشاءهای سلولی از طریق خارج‌نمودن انواع مختلفی از یون‌ها و ملکول‌ها و به‌واسطه وجود سیستم‌های انتقالی انتخابی برای حرکت عرض‌غشایی[1] مواد، ترکیب فضایی را کنترل می‌کنند که دربر می‌گیرند. غلظت مواد موجود در بخش‌های سلولی از طریق کنترل جابه‌جایی مواد، کوفاکتورها و یون‌ها در عرض غشاءها، تعدیل می‌شود. تنظیم‌کننده‌های خارج‌سلولی فعالیت سلولی، به گیرنده‌های پروتئینی موجود در غشاءهای پلاسمایی اتصال یافته و پیام آنها از گیرنده‌های غشایی به مسیر متابولیکی مناسبی انتقال داده می‌شود. غشاءهای پلاسمایی در شناسایی سلول-سلول، در حفظ شکل سلول، و در حرکت سلولی نقش دارند.

۲-۱۲ • ترکیب شیمیایی غشاءها

لیپیدها و پروتئین‌ها اجزاء اصلی تمامی غشاءها هستند. غلظت این اجزاء در میان غشاءها تفاوت‌های زیادی با یکدیگر دارند (شکل ۲-۱۲). پروتئین‌ها مسئول فعالیت غشاءها هستند و برحسب منبع، غشاءهای مختلف مجموعه‌های بسیار اختصاصی از پروتئین‌ها

1. Transmembrane

را دارند. مقادیر کمی از پلی ساکاریدهای مختلف، به صورت گلیکوپروتئین یا گلیکولیپید، در غشاءها یافت می‌شوند، ولی کربوهیدرات آزاد وجود ندارد.



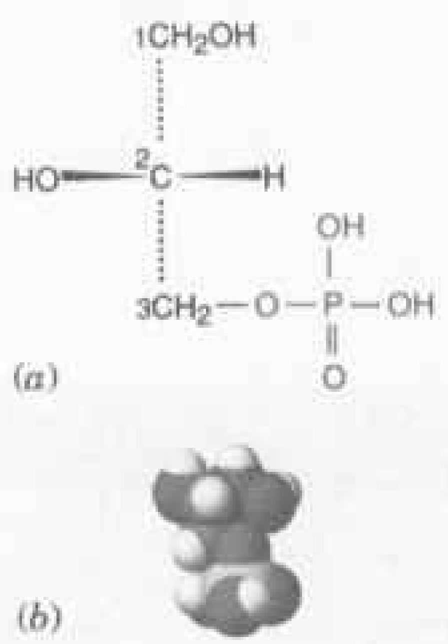
شکل ۲-۱۲ **درصد لیپید و پروتئین بین غشاءهای سلولی، متفاوت است.** تمامی مقادیر برای کبد موش صحرایی هستند، به غیر از غشاء پلاسمایی گلبول قرمز انسان. مقادیر مربوط به کبد سایر گونه‌ها، از جمله انسان، الگوی مشابهی را نشان می‌دهند.

لیپیدها اجزاء اصلی غشاءها هستند

گلیسروفسفولیپیدها، اسفنگولیپیدها و کلسترول اجزاء لیپیدی اصلی غشاءهای اوکاریوتی هستند. گلیسروفسفولیپیدها و اسفنگومیلین، اسفنگولیپیدی که حاوی فسفات است، به‌عنوان **فسفولیپید** طبقه‌بندی می‌شوند. باکتری‌ها و جلبک‌های آبی ـ سبز حاوی گلیسرولیپیدهایی هستند که در آنها یک کربوهیدرات اتصال کووالان مستقیم به گلیسرول دارد. برخی غشاءها حاوی مقادیر بسیار کمی از لیپیدهای دیگری نظیر تری‌آسیل‌گلیسرول و مشتقات دیول (ص ۹۲۶) و همچنین لیپیدهایی با اتصال کووالان به پروتئین هستند. لیپیدها نقش ساختمانی دارند، ولی ممکن است فعالیت‌های دیگری را نیز برعهده داشته باشند.

گلیسروفسفولیپیدها فراوان‌ترین لیپیدهای موجود در غشاءها هستند

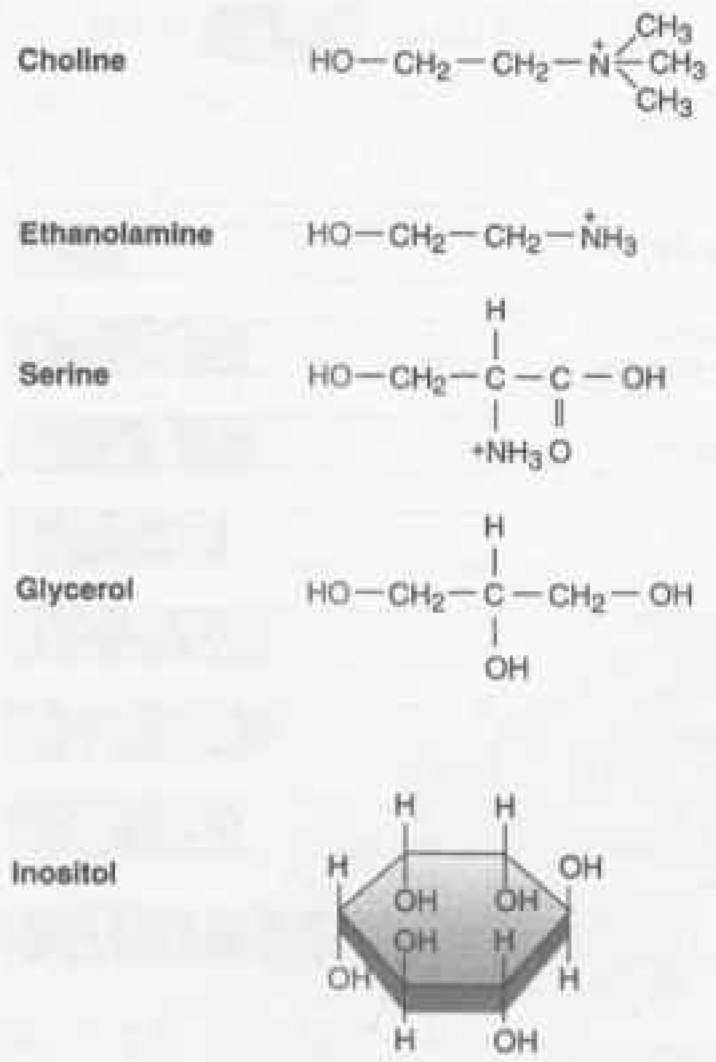
گلیسروفسفولیپیدها (فسفوگلیسریدها) یک ملکول گلیسرول با یک فسفات استری‌شده در کربن α دارند (شکل ۳-۱۲) و دو اسید چرب زنجیر ـ بلند با اتم‌های کربن باقیمانده آن ایجاد استر کرده‌اند (شکل ۴-۱۲). گلیسرول فاقد کربن نامتقارن است، ولی اتم‌های کربن α از نظر فضایی یکسان نیستند. استری‌شدن یک فسفات با یکی از این اتم‌های کربن α سبب می‌شود تا ملکول نامتقارن گردد. گلیسروفسفولیپیدهایی که به‌طور طبیعی وجود دارند، با سیستم عددگذاری دارای ویژگی فضایی[1] (sn) مشخص می‌گردند که در ص ۹۵۲ به آن پرداخته می‌شود.



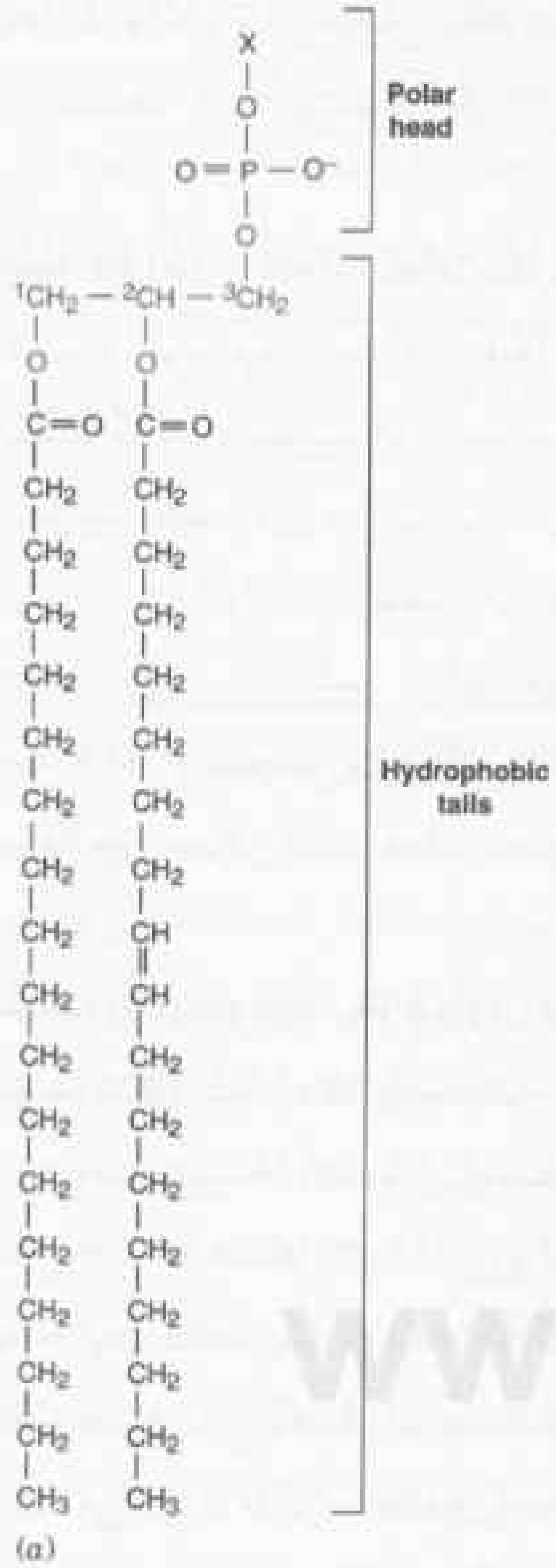
شکل ۳-۱۲ **L-گلیسرول ۳-فسفات.** (a) کونفیگوراسیون شیمی‌فضایی L-گلیسرول ۳-فسفات (sn-گلیسرول ۳-فسفات). H و OH متصل به C2 در بالا و C1 و C3 در پایین صفحه قرار دارند. (b) مدل فضا-پرکن L-گلیسرول ۳-فسفات. طرح رنگی: H سفید، C خاکستری، O قرمز، N سبز، و P زرد.

۲،۱-دی‌آسیل‌گلیسرول ۳-فسفات یا **اسید فسفاتیدیک** ترکیب مادر گلیسروفسفولیپیدها است. **کولین، اتانل‌آمین، سرین، گلیسرول، و اینوزیتول با یک پل فسفودی‌استری به گلیسرول اتصال می‌یابند** (شکل ۵-۱۲). **فسفاتیدیل اتانل‌آمین، (گلیسروفسفولیپیدهای اتانل‌آمینی یا سفالین[2])** و **فسفاتیدیل کولین (گلیسروفسفولیپید کولینی یا لسیتین)** معمول‌ترین گلیسرو-فسفولیپیدهای موجود در غشاءها هستند (شکل ۶-۱۲). **فسفوگلیسرید فسفاتیدیل‌گلیسرولی** (شکل ۷-۱۲) **(دی‌فسفاتیدیل‌گلیسرول یا کاردیولیپین)** حاوی دو اسید فسفاتیدیک است که از طریق یک گلیسرول به یکدیگر اتصال یافته‌اند و تقریباً به‌طور منحصر در غشاءهای داخل میتوکندریایی و غشاءهای باکتریایی یافت می‌شود. اینوزیتول، یک الکل هگزاهیدروکسی، با فسفات در فسفاتیدیل اینوزیتول ایجاد استر کرده است (شکل ۸-۱۲). مشتقات فسفریله مختلفی در غشاءهای مختلف قرار دارند؛ فسفاتیدیل اینوزیتول ۴-فسفات در گلژی، فسفاتیدیل اینوزیتول ۴، ۵-بیس‌فسفات در غشاءهای پلاسمایی و فسفاتیدیل اینوزیتول

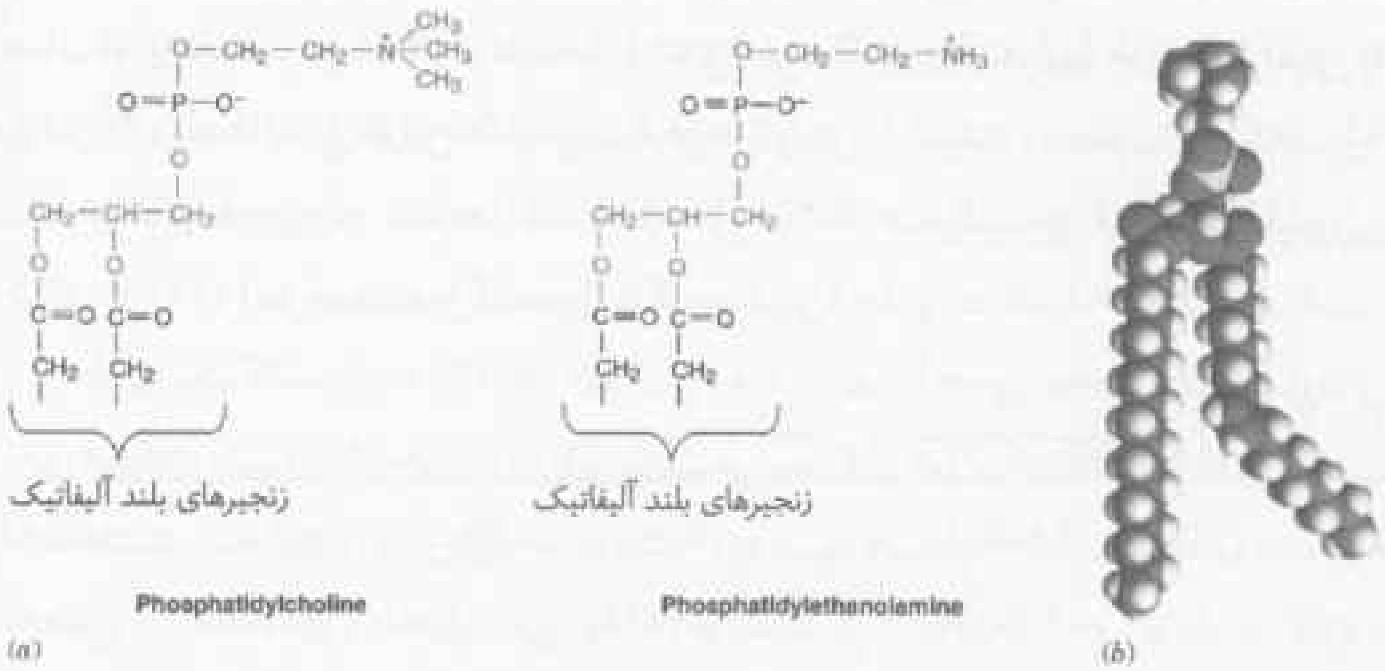
1. Stereospecific numbering   2. Cephalin



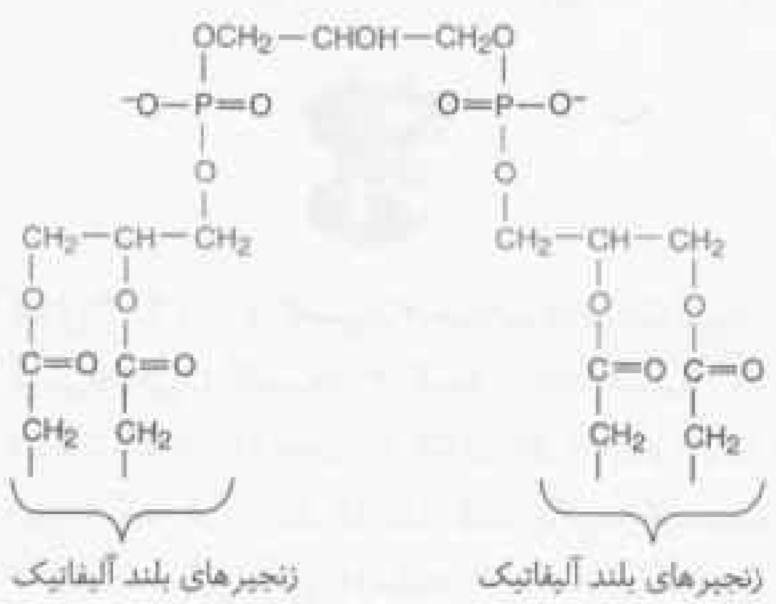
شکل ۵-۱۲ ساختمان‌های مربوط به الکل‌های اصلی که با اسید فسفاتیدیک استری شده و تولید گلیسروفسفولیپید می‌کنند.



شکل ۴-۱۲ **ساختمان گلیسروفسفولیپید.** (a) اسیدهای چرب زنجیر - بلند در C1 و C2 L-گلیسرول ۳-فسفات استری شده‌اند. X می‌تواند یک H (اسید فسفاتیدیک) یا یکی از چندین الکل موجود در شکل ۵-۱۲ باشد. (b) مدل فضا-پرکن. برای طرح رنگی شکل ۳-۱۲ را ببینید.



شکل ۶-۱۲ **ساختمان دو مورد از معمول‌ترین گلیسروفسفولیپیدها.** (a) اسید فسفاتیدیل‌کولین و اسید فسفاتیدیل‌اتانل‌آمین. (b) مدل فضا-پرکن فسفاتیدیل‌کولین. برای طرح رنگی شکل ۳-۱۲ را ببینید.



شکل ۷-۱۲ **فسفاتیدیل‌گلیسرول فسفوگلیسرید (کاردیولیپین).**

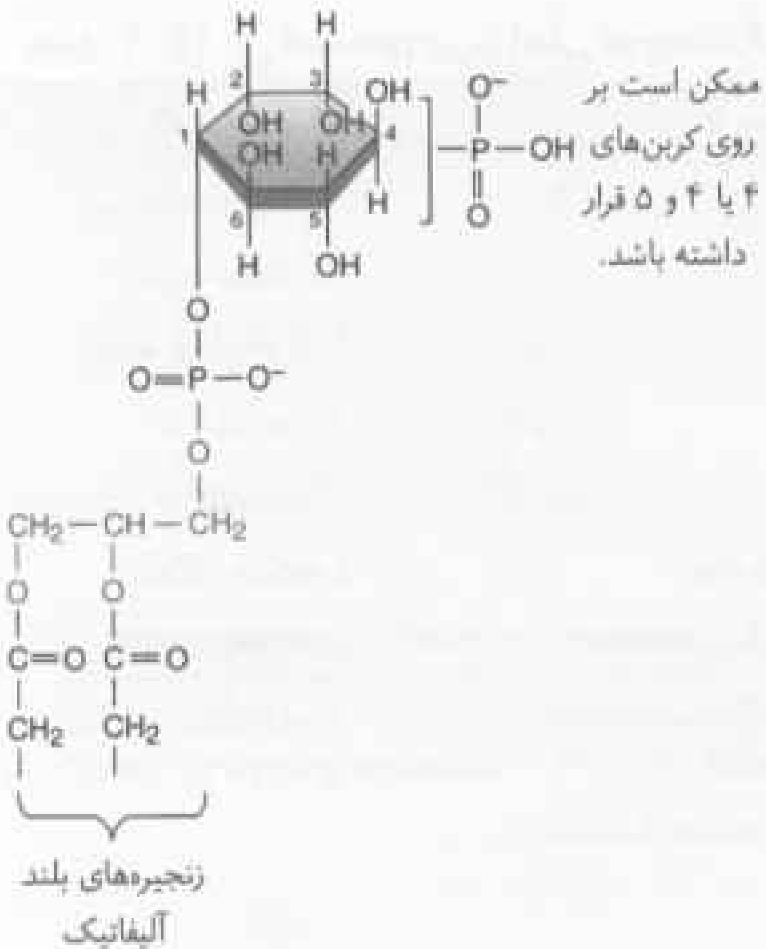
۳-فسفات و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳،۵-بیس‌فسفات در آندوزوم‌ها غالب می‌باشند (یک نگاه دقیق‌تر ۱-۱۲).

دو اسید چرب با کربن‌های ۱ و ۲ گلیسرول در گلیسروفسفولیپیدها استری می‌شوند؛ انواع اصلی اینها در جدول ۱-۱۲ آورده شده‌اند. معمولاً یک اسید چرب اشباع بر روی کربن ۱ و یک اسید چرب غیراشباع بر روی کربن ۲ قرار دارد. ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ گونه ملکولی در غشاءها وجود دارند که دلیل آن اساساً تعداد ترکیب‌های احتمالی اسیدهای چرب موجود در فسفو- و اسفنگولیپیدهای مختلف می‌باشد. براساس نام کلاس‌های مختلف فسفولیپیدها، اسیدهای چرب اختصاصی موجود در آنها مشخص نمی‌شود. فسفاتیدیل کولین معمولاً حاوی اسید چرب پالمیتیک یا استناریک بر روی کربن ۱ و یک اسید چرب ۱۸ کربنه غیراشباع اسید اولئیک، لینولئیک یا لینولنیک بر روی کربن ۲ هستند.

فسفاتیدیل اتانل‌آمین حاوی اسید پالمیتیک یا اولئیک در کربن ۱ و یک اسید چرب زنجیر-بلند غیراشباع با چند پیوند دوگانه نظیر اسید آراشیدونیک در موقعیت ۲ می‌باشد. ترکیب اسید چرب لیپیدها اثر قابل توجهی بر عملکرد غشاء دارد. گروه‌های آسیل چرب موجود در یک بافت گونه‌های مختلف بسیار شبیه هستند. ترکیب گروه آسیل می‌تواند تحت شرایط تغذیه‌ای و پاتوفیزیولوژیکی مختلف تغییر نماید.

یک اسید چرب اشباع یک زنجیر مستقیم، همانند حالت اسیدهای چرب غیراشباع ترانس، می‌باشد. پیوند دوگانه سیس که در اکثر اسیدهای چرب طبیعی وجود دارد، یک خمیدگی در زنجیر هیدروکربنی به‌وجود می‌آورد (شکل ۹-۱۲). وجود اسیدهای چرب غیراشباع در فسفولیپیدها تأثیر قابل توجهی بر سیالیت غشاء دارد (ص ۶۳۸).

گلیسرول فسفولیپیدهای اتری یک زنجیر آلیفاتیک بلند با اتصال اتری به کربن ۱ گلیسرول دارند (شکل ۱۰-۱۲). فسفولیپیدهای اتری حاوی یک گروه آلکیل (آلکیل آسیل گلیسرو-فسفولیپید) یا یک اتر حاوی پیوند دوگانه α، β **پلاسمالوژن** نامیده می‌شوند. پلاسمالوژن‌های



شکل ۸-۱۲ **فسفاتیدیل اینوزیتول.** گروه‌های فسفات بر روی C4 یا C4 و C5 اینوزیتول نیز یافت می‌شوند. گروه‌های فسفات دیگر سبب افزایش بار موجود در سر قطبی این گلیسروفسفولیپید می‌شود.

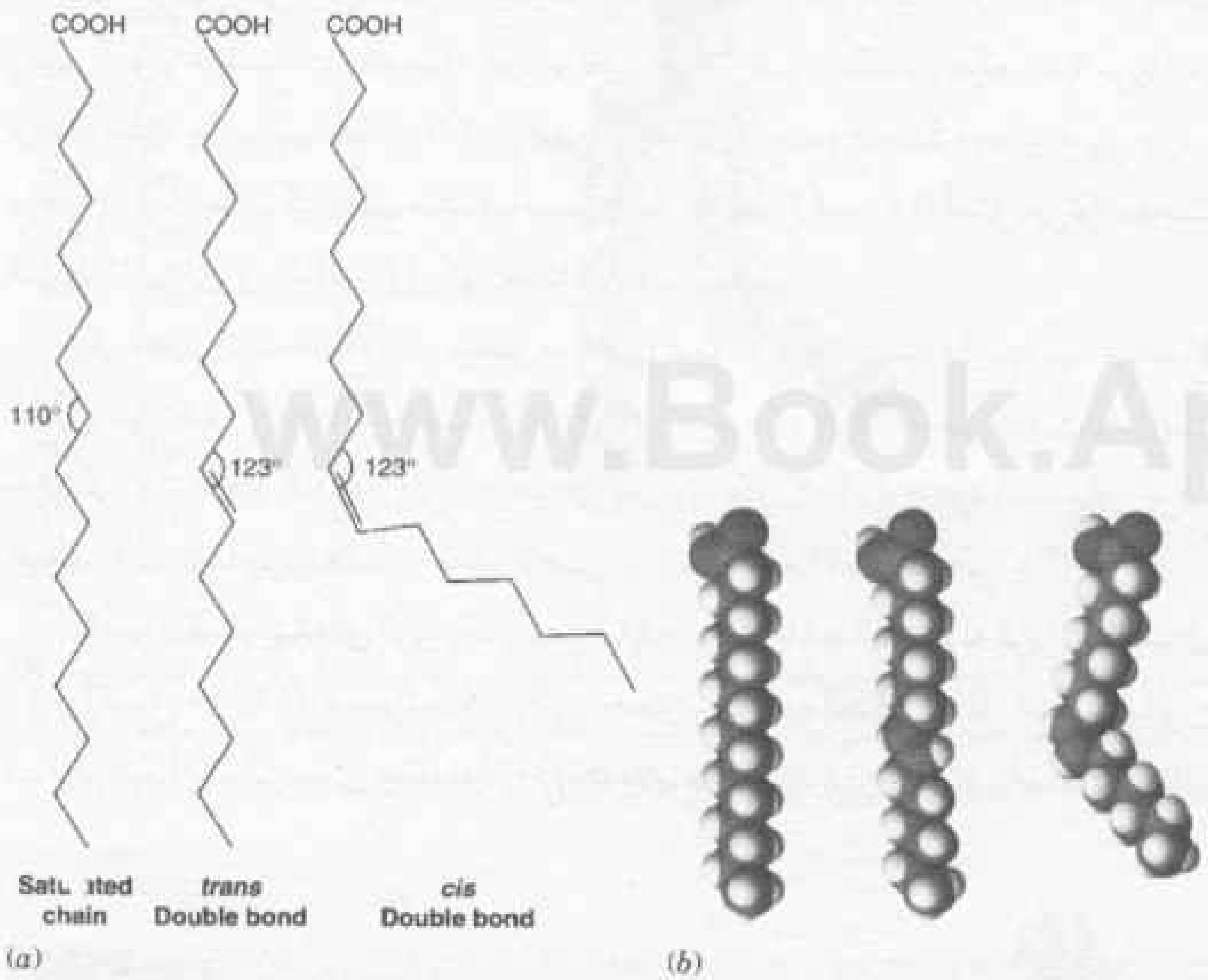
یک نگاه دقیق‌تر ۱-۱۲

فسفاتیدیل اینوزیتول‌ها فعالیت‌های مختلفی دارند

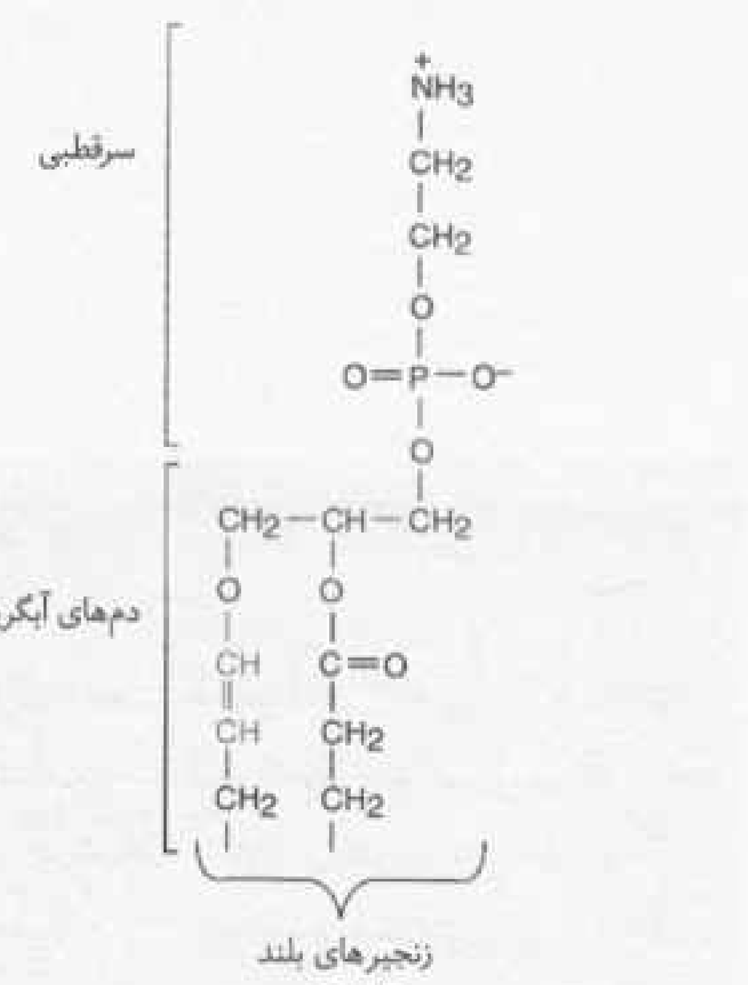
فسفاتیدیل اینوزیتول‌های موجود در سلول‌ها، فعالیت‌های متنوعی را برعهده دارند. این ترکیبات در غشاءها به‌عنوان منبع پیامبرهای دوم (ص.۷۲۶)، در فعال‌سازی کانال‌های یونی غشایی (ص.۶۴۷)، در فعال‌سازی آنزیم‌ها، در فرایندهای آندو- و اگزوسیتوز، و به‌عنوان لنگرهایی برای پروتئین‌ها (ص.۶۳۶) فعالیت دارند. فسفاتیدیل اینوزیتول ۴،۵-بیس‌فسفات منبع پیامبرهای دوم و دی‌آسیل گلیسرول است (ص.۷۲۷) که در فعالیت برخی هورمون‌ها نقش دارند. فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-فسفات و فسفاتیدیل-اینوزیتول ۳، ۵-بیس‌فسفات احتمالاً در کنترل تردد غشایی در آندوزوم‌ها نقش دارند. اینها همچنین در اسکلت سلولی و کنترل شکل سلول و حرکت همکاری دارند و در فعالیت‌های سیتوزولی و هسته‌ای شرکت می‌کنند. آنزیم‌های متابولیزه‌کننده فسفاتیدیل اینوزیتول‌ها با بیماری‌های انسانی در ارتباط هستند.

جدول ۱-۱۲ • اسیدهای چرب اصلی موجود در گلیسروفسفولیپیدها

فرمول ساختمانی	نام سیستماتیک	نام معمول
$CH_3-(CH_2)_{12}-COOH$	Tetradecanoic	Myristic acid
$CH_3-(CH_2)_{14}-COOH$	Hexadecanoic	Palmitic acid
$CH_3-(CH_2)_5-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$	*cis*-9-Hexadecenoic	Palmitoleic acid
$CH_3-(CH_2)_{16}-COOH$	Octadecanoic	Stearic acid
$CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOH$	*cis*-9-Octadecenoic acid	Oleic acid
$CH_3-(CH_2)_3-(CH_2-CH=CH)_2-(CH_2)_7-COOH$	*cis, cis*-9, 12-Octadecadienoic	Linoleic acid
$CH_3-(CH_2-CH=CH)_3-(CH_2)_7-COOH$	*cis, cis, cis*-9, 12, 15-Octadecatrienoic	Linolenic acid
$CH_3-(CH_2)_3-(CH_2-CH=CH)_4-(CH_2)_3-COOH$	*cis, cis, cis, cis*-5, 8, 11, 14-Icosatetraenoic	Arachidonic acid



شکل ۹-۱۲ **کونفورماسیون گروه‌های آسیل چرب موجود در فسفولیپیدها.** (a) اسیدهای چرب اشباع (پالمیتیک) و غیراشباع (پالمیتولئیک) با پیوندهای دوگانه ترانس، زنجیرهای مستقیم هستند و در کونفورماسیون حداقل انرژی قرار دارند، در حالی‌که زنجیر دارای یک پیوند دوگانه سیس (پالمیتولئیک) دارای یک خمیدگی است. پیوند دوگانه ترانس در اسیدهای چرب طبیعی نادر می‌باشد. (b) مدل‌های فضا-پرکن. برای طرح رنگی شکل ۳-۱۲ را ببینید.

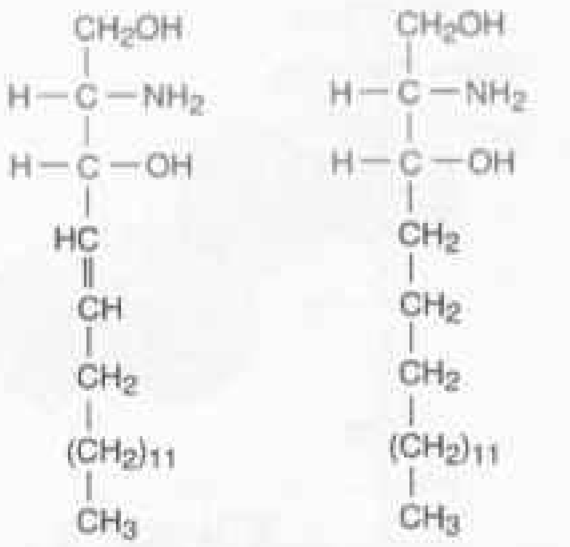


شکل ۱۰-۱۲ **پلاسمالوژن اتانل‌آمین.** با اتصال اتری زنجیر آلیفاتیک بر روی C1 گلیسرول توجه کنید.

حاوی اتانل‌آمین **(پلاسمالوژن اتانل‌آمینی)** یا کولین **(پلاسمالوژن کولینی)** استری‌شده با فسفات، در بافت عصبی و قلب، و نه در کبد، فراوان هستند. بیش از ۵۰٪ گلیسرو-فسفولیپیدهای اتانل‌آمینی موجود در قلب انسان از انواع پلاسمالوژن‌ها هستند. مقادیر

جدول ۲-۱۲ • بار غالب موجود در گلیسروفسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها

بار خالص	باز	گروه فسفات	لیپیدها
۰	+۱	-۱	Phosphatidylcholine
۰	+۱	-۱	Phosphatidylethanolamie
-۱	+۱,-۱	-۱	Phosphatidylserine
-۱	۰	-۱	Phosphatidylglycerol
-۲	۰	-۲	Diphosphatidylglycerol (cardiolipin)
-۱	۰	-۱	Phosphatidylinositol
۰	+۱	-۱	Sphingomyelin



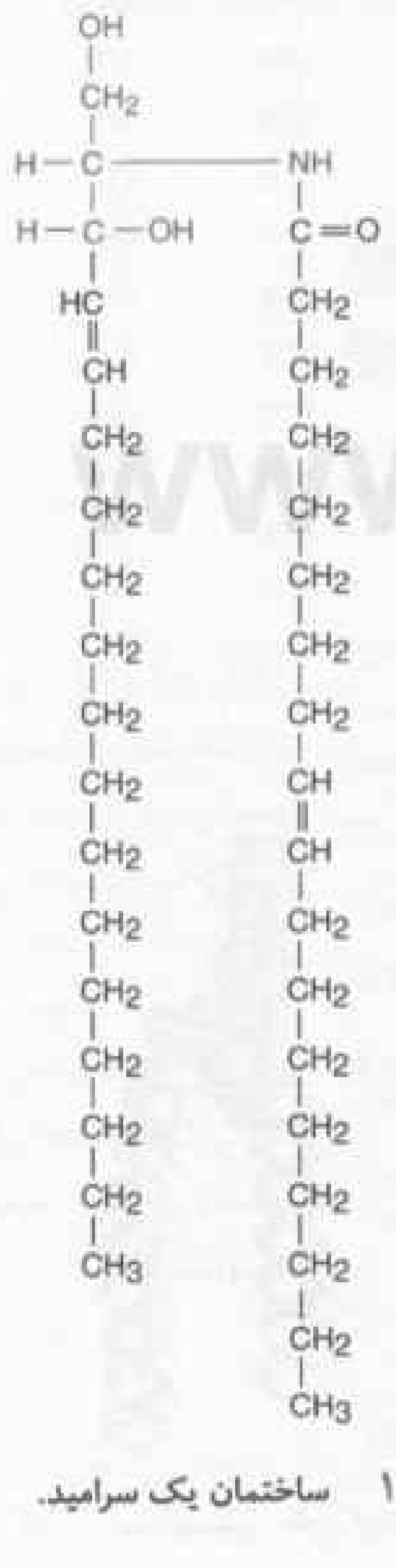
Sphingosine (D-4-sphingenine) **Dihydrosphingosine** (D-dihydrosphingenine)

شکل ۱۱-۱۲ ساختمان‌های مربوط به اسفنگوزین و دی‌هیدرواسفنگوزین.

بالای لیپیدهای با اتصال اتری در غشاءهای پلاسمایی مربوط به سلول‌های سرطانی متاستاتیک گزارش شده است که نقش این لیپیدها در خصوصیات تهاجمی این سلول‌ها را نشان می‌دهد.

گلیسروفسفولیپیدها دوگانه‌دوست هستند

گلیسروفسفولیپیدها **دوگانه‌دوست**[1]، با یک انتهای قطبی و یک انتهای غیرقطبی، هستند. بار موجود در انتهای قطبی (گروه سر) شامل یک فسفات باردار (pKحدود ۲) که در ۷٫۰ pH بار منفی دارد و هر نوع بار مربوط به گروه‌های (بازهای) موجود بر روی این فسفات می‌باشد (جدول ۲-۱۲). گلیسروفسفولیپیدهای کولینی و اتانل‌آمینی در ۷٫۰ pH **زویتریون**[2] هستند که یک بار منفی بر روی فسفات و یک بار مثبت بر روی نیتروژن دارند. فسفاتیدیل سرین یک بار مثبت بر روی گروه α-آمینوی سرین و دو بار منفی، یکی بر روی فسفات و دیگری بر روی گروه کربوکسیل سرین، دارد که بار خالص آن ۱- می‌باشد. برعکس، گلیسروفسفولیپیدهای حاوی اینوزیتول و گلیسرول تنها یک بار منفی بر روی فسفات دارند. مشتقات ۴-فسفواینوزیتول و ۴، ۵-بیس‌فسفواینوزیتول، ترکیبات بسیار قطبی با بارهای منفی بر روی فسفات هستند. انتهای غیرقطبی گلیسروفسفولیپیدها متشکل از زنجیرهای هیدروکربنی آبگریز مربوط به گروه‌های آسیل چرب است.



شکل ۱۲-۱۲ ساختمان یک سرامید.

اسفنگولیپیدها در غشاءها وجود دارند

الکل‌های آمینوی **اسفنگوزین** (D-۴-اسفنگنین) و **دی‌هیدرواسفنگوزین** (شکل ۱۱-۱۲) پایه **اسفنگولیپیدها** هستند. **سرامید** حاصل اتصال یک گروه آسیل چرب زنجیر - بلند اشباع یا غیراشباع با پیوند آمیدی به گروه آمینوی **اسفنگوزین** (شکل ۱۲-۱۲) می‌باشد. استخلاف‌های مختلفی بر روی گروه هیدروکسیل کربن ۱ اسفنگوزین وجود دارند. اسفنگومیلین‌ها به عنوان فراوان‌ترین اسفنگولیپیدها در بافت‌های پستانداران، در کربن ۱ حاوی فسفوریل‌کولین

1. Amphipathic 2. Zwitterion

هستند (شکل ۱۳-۱۲) و به عنوان فسفولیپید طبقه‌بندی می‌شوند. اسفنگومیلین و گلیسرو-فسفولیپید کولینی از نظر ساختمانی مشابه هستند و خصوصیات مشترک زیادی دارند؛ هر دو دوگانه‌دوست می‌باشند. ترکیب اسید چرب اسفنگومیلین از بافتی به بافت دیگر متفاوت است؛ اسفنگومیلین موجود در میلین غالباً حاوی اسیدهای چرب زنجیر-بلند (۲۴ کربنه) است.

گلیکواسفنگولیپیدها حاوی یک واحد قندی با اتصال β-گلیکوزیدی به گروه هیدروکسیل کربن ۱ یک سرامید هستند؛ این ترکیبات فاقد فسفات و بدون بار می‌باشند. **سربروزیدها** یکی از زیرگروه‌ها هستند که گلوکز (**گلوکوسربروزیدها**) یا گالاکتوز (**گالاکتوسربروزیدها**) دارند. **فرنوزین**[1] (شکل ۱۴-۱۲) گالاکتوسربروزیدی است که یک اسید چرب ۲۴ کربنه با اتصال آمیدی دارد. گالاکتوسربروزیدها در مغز و بافت عصبی غالب هستند، در حالی که گلوکوسربروزیدها به مقادیر کم در بافت‌های غیرعصبی یافت می‌شوند. گالاکتوسربروزرید حاوی یک گروه سولفات متصل به کربن ۳ قند را تحت عنوان **سولفاتید** طبقه‌بندی می‌کنند (شکل ۱۵-۱۲). سربروزیدها و سولفاتیدها معمولاً اسیدهای چرب ۲۶-۲۲ کربنه دارند. گلیکواسفنگولیپیدها اغلب ۲ (دی‌هگزوزید)، ۳ (تری‌هگزوزید) یا ۴ (تتراهگزوزید) ریشه قندی متصل به گروه هیدروکسیل ۱ سرامید دارند. اجزاء قندی معمول شامل دی‌گلوکز، دی‌گالاکتوز، **N-استیل دی‌گلوکزآمین** و **N-استیل دی‌گالاکتوزآمین** هستند.

گانگلیوزیدها پیچیده‌ترین گلیکواسفنگولیپیدها هستند که یک گروه اولیگوساکاریدی با یک یا چند ریشه **اسیدN-استیل‌نورامینیک (اسید سیالیک)** (صفحه ۸۸۸ را از نظر ساختمان ببینید) دارند؛ اینها ترکیبات دوگانه‌دوست با یک بار منفی در pH ۷٫۰ هستند و ۵٪ تا ۸٪ کل لیپیدهای مغز را شامل می‌شوند. حدود ۲۰ نوع مختلف مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که از نظر تعداد و موقعیت ریشه‌های هگزوز و اسید سیالیک با یکدیگر اختلاف دارند. در ص ۹۸۸ به شرح جزئیات گانگلیوزیدها پرداخته شده است. بخش کربوهیدراتی گانگلیوزیدها که به ماوراء سطح غشاء امتداد می‌یابند، در شناسایی سلول-سلول و اتصال هورمون‌ها و سموم باکتریایی، نظیر سم وبا (ص ۷۱۵) نقش دارد.

کلسترول یک جزء مهم غشاءهای پلاسمایی است

کلسترول یک ملکول آبگریز متراکم سخت است (شکل ۱۶-۱۲ را ببینید) که چهار حلقه اتصال‌یافته و یک زنجیر جانبی هیدروکربنی ۸ کربنه متصل به موقعیت ۱۷ در حلقه D دارد. کلسترول یک گروه هیدروکسی قطبی در کربن ۳ دارد. وجود کلسترول در غشاءها سبب تغییر سیالیت و کاهش نفوذپذیری می‌شود.

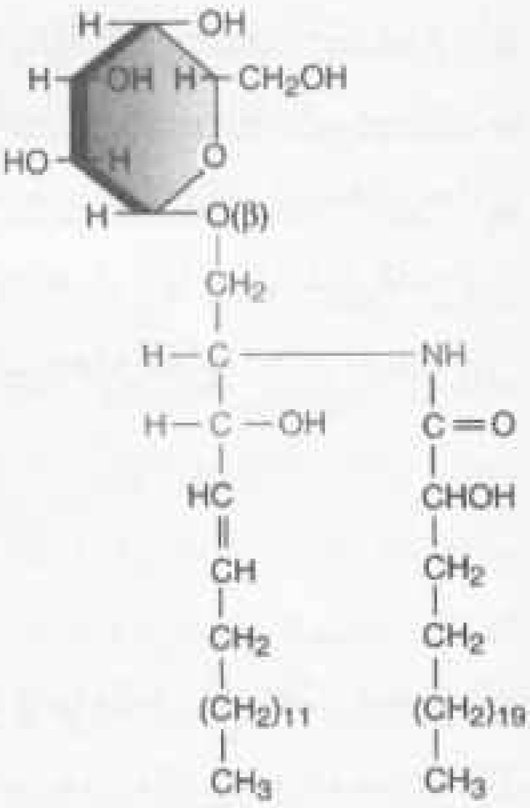
ترکیب لیپیدی غشاءها با یکدیگر متفاوت است

غشاءهای پلاسمایی و داخل سلولی ترکیبات لیپیدی متفاوتی دارند (شکل ۱۷-۱۲). غشاءهای

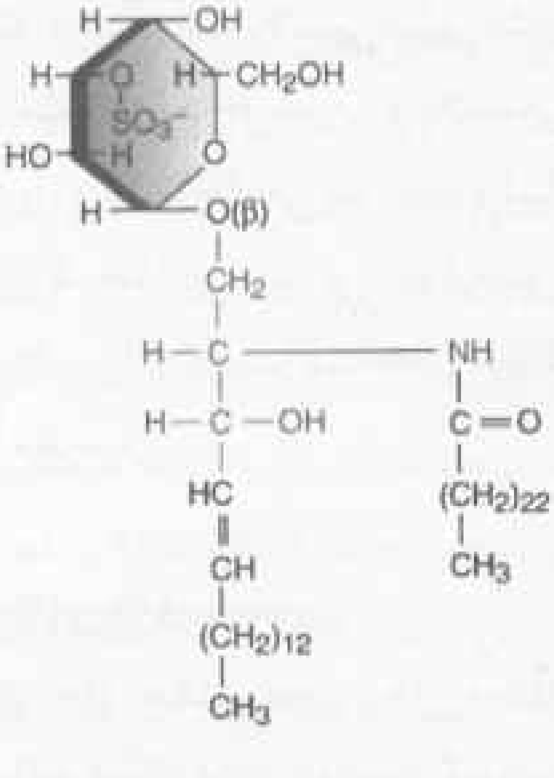


شکل ۱۳-۱۲ اسفنگومیلین حاوی کولین. (a) ساختمان اسفنگومیلین حاوی کولین (b) مدل فضا-پرکن. برای طرح رنگی شکل ۳-۱۲ را ببینید.

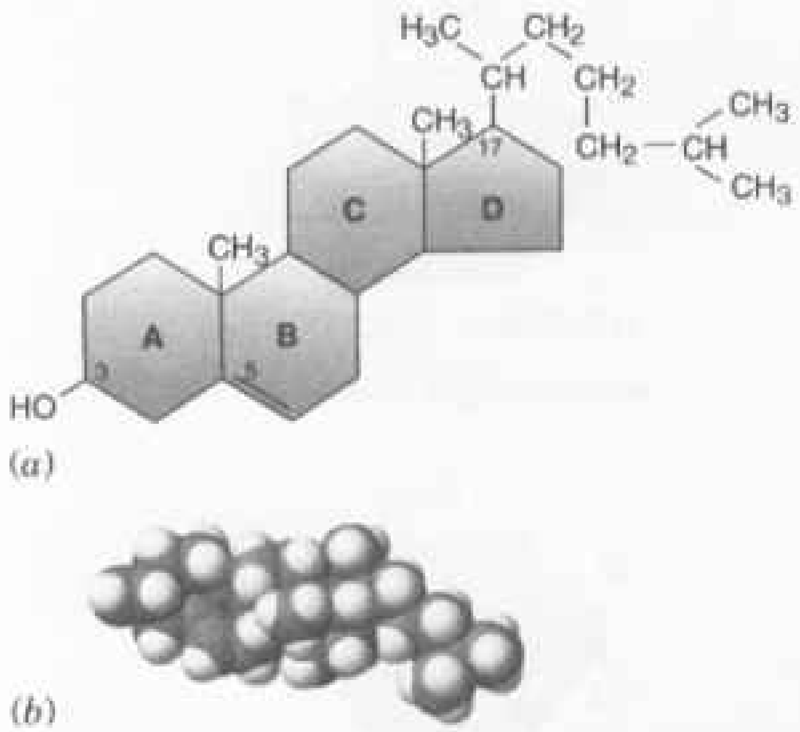
1. Phrenosine



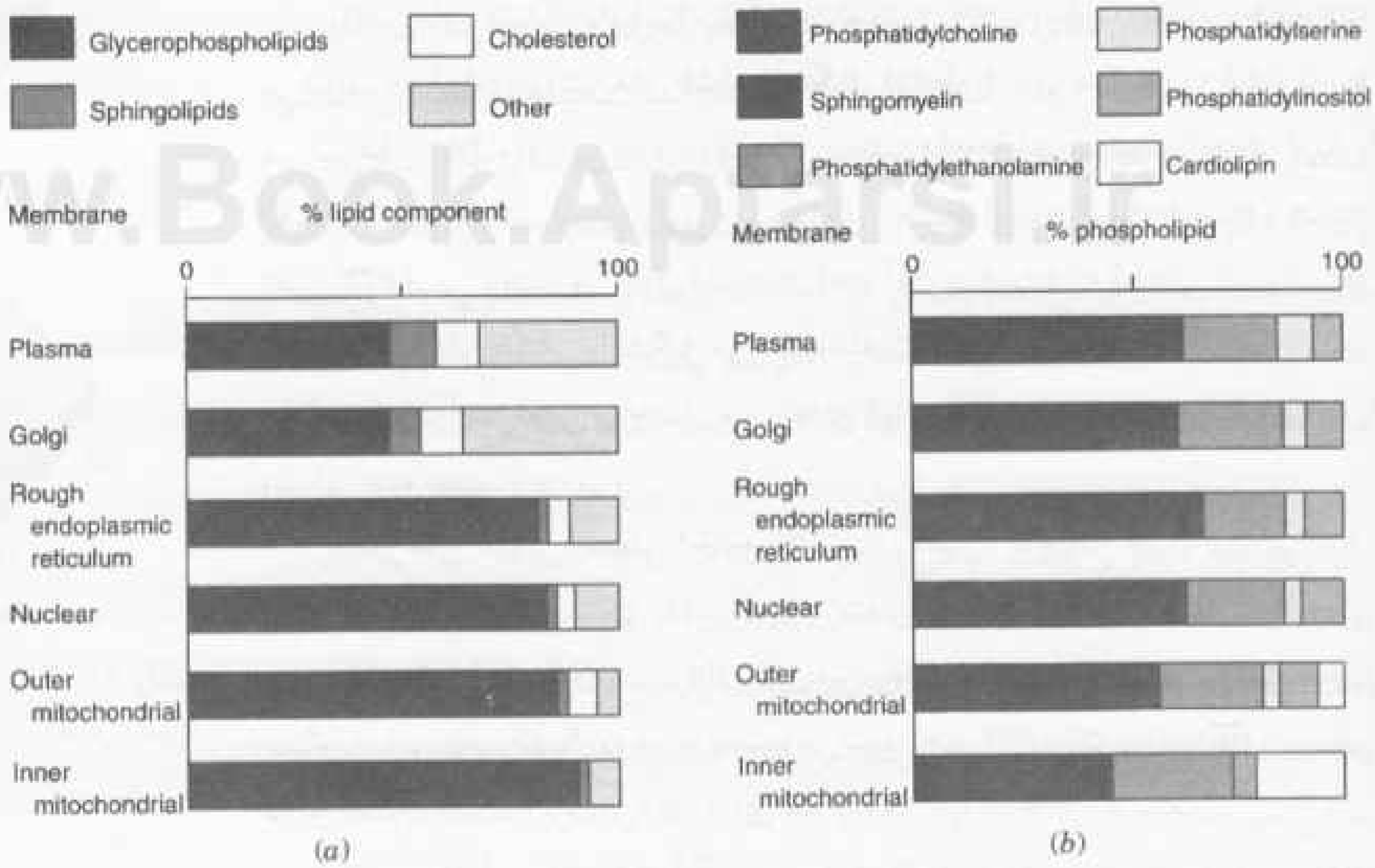
شکل ۱۴-۱۲ ساختمان یک گالاکتوسربروزید حاوی یک اسید چرب ۲۴ کربنه.



شکل ۱۵-۱۲ ساختمان یک سولفاتید.



شکل ۱۶-۱۲ **کلسترول.** (a) ساختمان کلسترول. (b) مدل فضا- پرکن. برای طرح رنگی شکل ۳-۱۲ را ببینید.



شکل ۱۷-۱۲ **ترکیب لیپیدی غشاءهای سلولی جداشده از کبد موش صحرایی.** (a) میزان اجزاء لیپیدی اصلی به صورت درصد لیپید. ناحیه‌ای که با «other» مشخص شده است، شامل منو-، دی-، و تری‌آسیل گلیسرول، اسیدهای چرب و استرهای کلسترول است. (b) ترکیب فسفو-لیپیدی به‌عنوان درصدی از کل فسفولیپید.

مربوط به یک بافت اختصاصی، برای مثال کبد، در گونه‌های مختلف، کلاس‌های بسیار مشابه لیپیدها را دارند. غشاء پلاسمایی بیشترین تنوع را از نظر درصد اجزاء نشان می‌دهد، زیرا محتوای کلسترول آن تحت تأثیر وضعیت تغذیه‌ای حیوان قرار دارد. غشاءهای میلینی مربوط به آکسون‌های عصبی غنی از اسفنگولیپیدها هستند و نسبت بالای گلیکواسفنگولیپیدها را دارند. غشاءهای داخل‌سلولی، برای مثال شبکه آندوپلاسمی، اساساً حاوی گلیسرو-فسفولیپیدها و مقادیر کم گلیکولیپیدها هستند. ترکیب لیپیدی غشاءهای مربوط به میتوکندری،

هسته، و شبکه آندوپلاسمی خشن مشابه هستند، و غشاء مربوط به کمپلکس گلژی در محلی بین غشاءهای داخل سلولی و پلاسمایی قرار دارد. کادریولیپین در غشاء داخلی میتوکندری زیاد و در غشاء خارجی کم است و اساساً در غشاءهای دیگر وجود ندارد. لیپیدهای حاوی کولین: فسفاتیدیل‌کولین و اسفنگومیلین، فراوان‌تر هستند و بعد از آنها فسفاتیدیل اتانل‌آمین قرار دارد. ثبات ترکیب غشاءهای مختلف ارتباطی را بین لیپیدها و فعالیت‌های اختصاصی آنها مطرح می‌کند.

پروتئین‌های غشایی

پروتئین‌های غشایی فعالیت‌های مختلفی را برعهده دارند؛ اینها شامل یک نقش ساختمانی در حفظ شکل غشاء، به عنوان گیرنده برای اتصال به هورمون‌ها و فاکتورهای رشد، به‌عنوان تسهیل‌کننده حرکت عرض‌غشایی مواد و یون‌ها، و به‌عنوان آنزیم در تبدیل پیام‌ها (ص ۷۰۰) می‌باشند. حدود ۳۰٪ ژن‌های موجود در سلول‌های پستانداران، پروتئین‌های غشایی را کد می‌کنند.

پروتئین‌های غشایی براساس سادگی جداسازی پروتئین از لیپید غشایی طبقه‌بندی می‌شوند. جداسازی **پروتئین‌های غشایی اینتگرال (داخلی)**[1] نیاز به تخریب غشاء توسط دترژنت‌ها یا *حلال‌های آلی دارد و وقتی این پروتئین‌ها جدا شدند، معمولاً حاوی لیپید با* اتصال محکم هستند. این پروتئین‌ها در داخل محیط لیپیدی غشاء غوطه‌ور هستند (ص ۶۳۳). این پروتئین‌ها حاوی اسیدهای آمینه آبگریز هستند که قطعاتی از پروتئین در تماس با لیپیدهای غشایی را تشکیل می‌دهند. ماهیت آبگریز این پروتئین‌ها، و بنابراین عدم حلالیت آنها در آب، تعیین ساختمان سه-بُعدی آنها و مطالعه خصوصیات وظیفه‌دار آنها را مشکل کرده است.

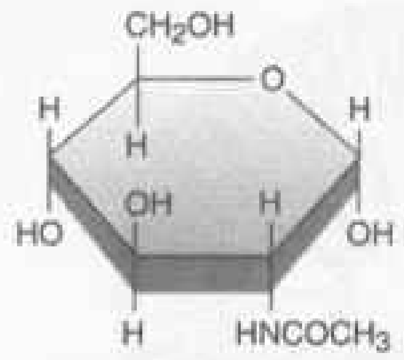
پروتئین‌های غشایی محیطی (خارجی)[2] اتصال سُست به سطح غشاء لیپیدی دارند. مجاورت با محلول‌های نمکی با قدرت یونی متفاوت، pHهای اسیدی یا بازی، یا تجزیه لیپید دارای اتصال کووالان سبب آزادسازی این پروتئین‌ها می‌شود. پروتئین‌های محیطی غشاء براساس نحوه اتصال به غشاء تقسیم می‌شوند (ص ۶۳۶). اکثر پروتئین‌های محیطی دارای اتصال سُست، پروتئین‌های کروی محلول در آب شاخص هستند.

پروتئولیپیدها[3] لیپوپروتئین‌های آبگریز محلول در کلروفرم و متانل و نامحلول در سیستم‌های آبی هستند. اینها در بسیاری از غشاءها وجود دارند، ولی به‌خصوص در میلین زیاد هستند که حدود ۵۰٪ جزء پروتئینی را تشکیل می‌دهند. **لیپوفیلین**[4] به عنوان یکی از لیپوپروتئین‌های میلین مغز، بیش از ۶۵٪ اسید آمینه آبگریز دارد و به شکل کووالان متصل به اسیدهای چرب می‌باشد (ص ۶۳۶ را در خصوص بحث پیرامون موقعیت و اتصال پروتئین‌های غشایی ببینید).

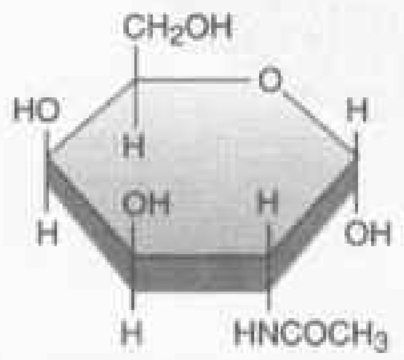
1. Integral (Intrinsic) 2. Peripheral (Extrinsic) 3. Proteolipids 4. Lipophilin

کربوهیدرات‌های غشایی قسمتی از گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها هستند

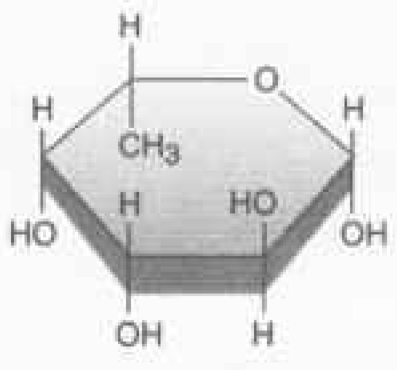
کربوهیدرات‌ها در غشاءها به‌صورت اولیگوساکاریدهای دارای اتصال کووالان به پروتئین‌ها (گلیکوپروتئین‌ها) و لیپیدها (گلیکولیپیدها) وجود دارند. قندهای موجود در این اولیگو-ساکاریدها شامل گلوکز، گالاکتوز، مانوز، فوکوز، N-استیل‌گالاکتوزآمین، N-استیل‌گلوکز-آمین، و N-استیل‌نورامینیک اسید (اسید سیالیک) می‌باشند (شکل ۱۸-۱۲ و ضمیمه). ساختمان گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدها به‌ترتیب در صفحات ۸۹۱ و ۹۸۵ به نمایش گذاشته شده است. کربوهیدرات در سطح خارج‌سلولی غشاء پلاسمایی و سطح مجرایی شبکه آندوپلاسمی قرار دارد. نقش کربوهیدرات‌های متصل به پروتئین شامل شناسایی و چسبندگی سلول-سلول، و فعالیت گیرنده‌ای می‌باشد. کربوهیدرات آزاد در غشاء وجود ندارد و یا میزان آن کم است.



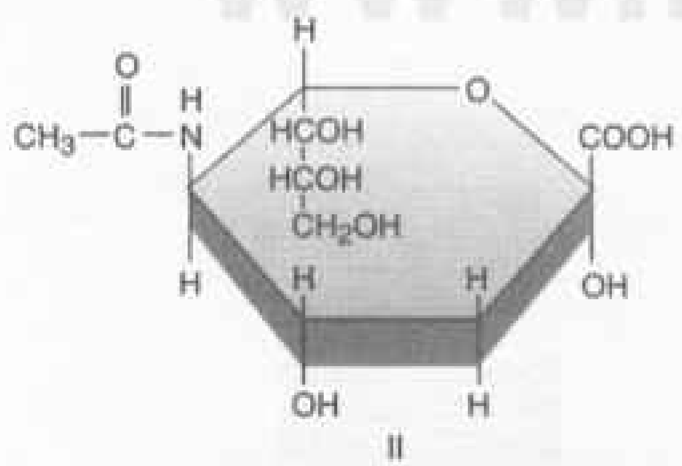
N-Acetyl-α-D-glucosamine



N-Acetyl-α-D-galactosamine



α-L-Fucose



N-Acetyl-D-neuraminic acid

شکل ۱۸-۱۲   ساختمان‌های مربوط به برخی کربوهیدرات‌های غشایی.

۳-۱۲ • میسل‌ها، دولایه‌های لیپیدی، و لیپوزوم‌ها

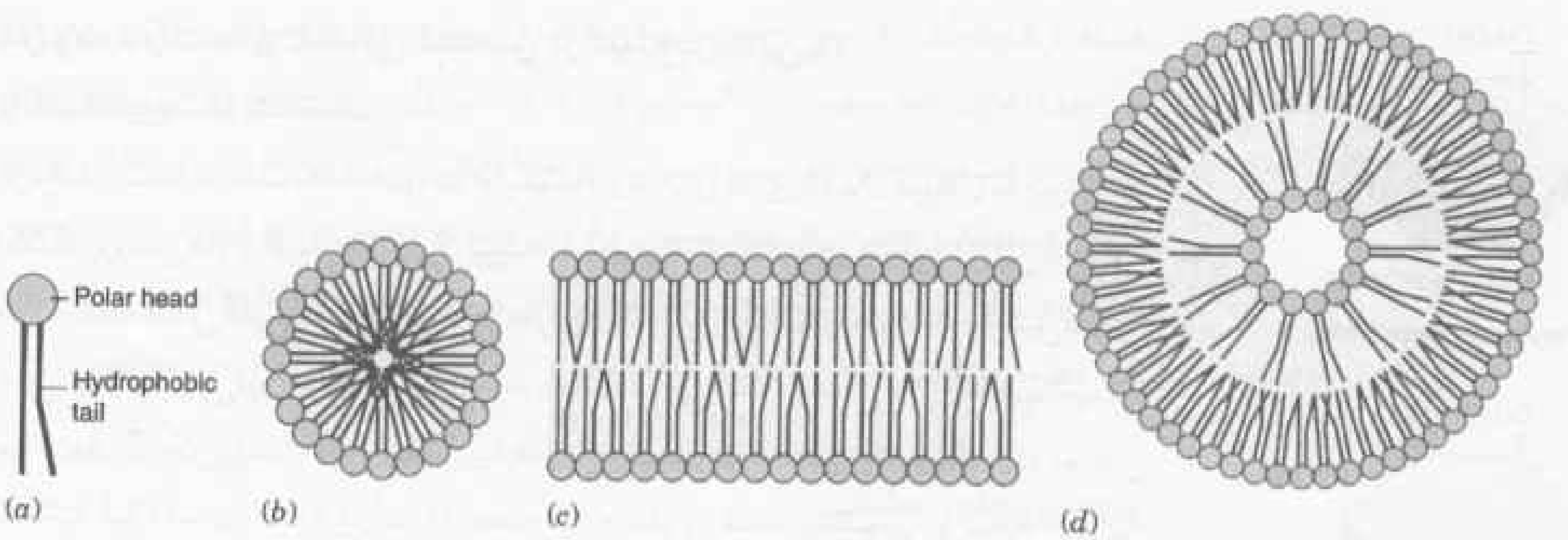
لیپیدها ساختمان‌های وزیکولی به‌وجود می‌آورند

خصوصیات ساختمانی پایه غشاءها ناشی از خصوصیات فیزیک‌وشیمیایی گلیسرو-فسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها است. این ترکیبات دوگانه‌دوست دارای یک سر آبدوست و یک دم آبگریز (شکل ۱۹a-۱۲) در سیستم‌های آبی تعامل نموده تا تولید ساختمان‌های کروی تحت عنوان **میسل** کنند (شکل ۱۹b-۱۲). گروه‌های سر قطبی باردار در سمت خارجی کره قرار دارند، در حالی که دم‌های آبگریز با یکدیگر در تعامل بوده و آب را دفع می‌کنند. میسل‌ها تنها یک سطح قطبی دارند که سمت در معرض فاز آبی است. میسل‌هایی را می‌توان تهیه نمود که حاوی یک لیپید یا مخلوطی از لیپیدها باشد. غلظت لیپید مورد نیاز برای تولید میسل را **غلظت میسلی بحرانی**[1] گویند(ص ۱۳۹۷). تولید میسل‌ها همچنین وابسته به درجه حرارت و، در صورت وجود مخلوطی از لیپیدها، به لیپیدهای مختلف است. به دلیل تعاملات آبگریز بین زنجیرهای هیدروکربنی و جذب گروه‌های سر قطبی به آب، ساختمان یک میسل بسیار پایدار می‌باشد. میسل‌ها در هضم و جذب لیپیدهای غذایی مهم هستند (ص ۱۳۹۷).

دولایه‌های ساختگی سنتتیک و لیپوزوم‌ها

لیپیدهای دوگانه‌دوستی، نظیر گلیسروفسفولیپیدها، همچنین می‌توانند یک ساختمان دولایه را دو لایه لیپیدی ایجاد کنند. در این ساختمان، حداقل تماس دم‌های هیدروکربنی با آب وجود دارد. گروه‌های سر قطبی در فصل مشترک محیط آبی و لیپیدی قرار دارند، و دم‌های آبگریز با ایجاد یک محیط آبگریز داخلی که آب را دفع می‌کنند، با یکدیگر در تعامل

1. Critical micelle concentration



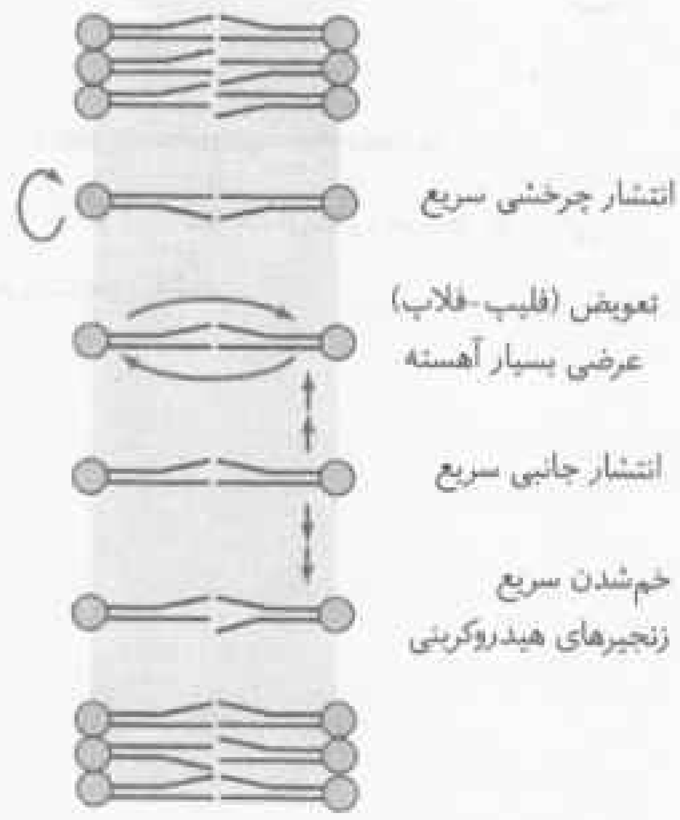
شکل ۱۹-۱۲ تعاملات فسفولیپیدها در یک محیط آبی. (a) نمایش یک لیپید آمفی‌پاتیک. (b) نمایی از برش عرضی ساختمان یک میسل. (c) نمایی از برش - عرضی ساختمان دولایه لیپیدی. (d) برش عرضی از یک لیپوزوم. هر کدام از این ساختمان‌ها، به دلیل تعاملات بین زنجیرهای هیدروکربنی و جذب گروه‌های سر قطبی به آب، یک پایداری ذاتی دارد.

هستند (شکل ۱۹c-۱۲). این آرایش فضایی دولایه‌ای اساس ساختمان لیپیدی پایه غشاءهای بیولوژیک را به وجود می‌آورد. دولایه‌های لیپیدی فوق‌العاده پایدار هستند. اینها از طریق ایجاد نیروهای آبگریز بین زنجیرهای هیدروکربنی و تعاملات یونی گروه‌های سر باردار با آب، در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. در صورت تخریب شدن، دولایه‌های لیپیدی خود - جوش[1] می‌باشند. یک دولایه لیپیدی یک وزیکول کروی به وجود می‌آورد که محیط خارجی را از یک بخش آبی درونی جدا می‌کند.

این نوع وزیکول‌ها که **لیپوزوم** نامیده می‌شوند (شکل ۱۹d-۱۲)، با استفاده از لیپیدهای خالص شده و مخلوط‌هایی از لیپیدهای مربوط به غشاءهای بیولوژیکی تهیه شده‌اند. برحسب روش اجرایی، وزیکول‌های تک‌لایه و چندلایه (وزیکول در وزیکول) با اندازه‌های مختلف (با قطر ۲۰ تا ۱۰۰۰ nm) تهیه می‌شوند. توانایی لیپیدهای دوگانه‌دوست در خود - همایش به دولایه‌ها، خصوصیت مهمی برای تولید غشاءهای سلولی است.

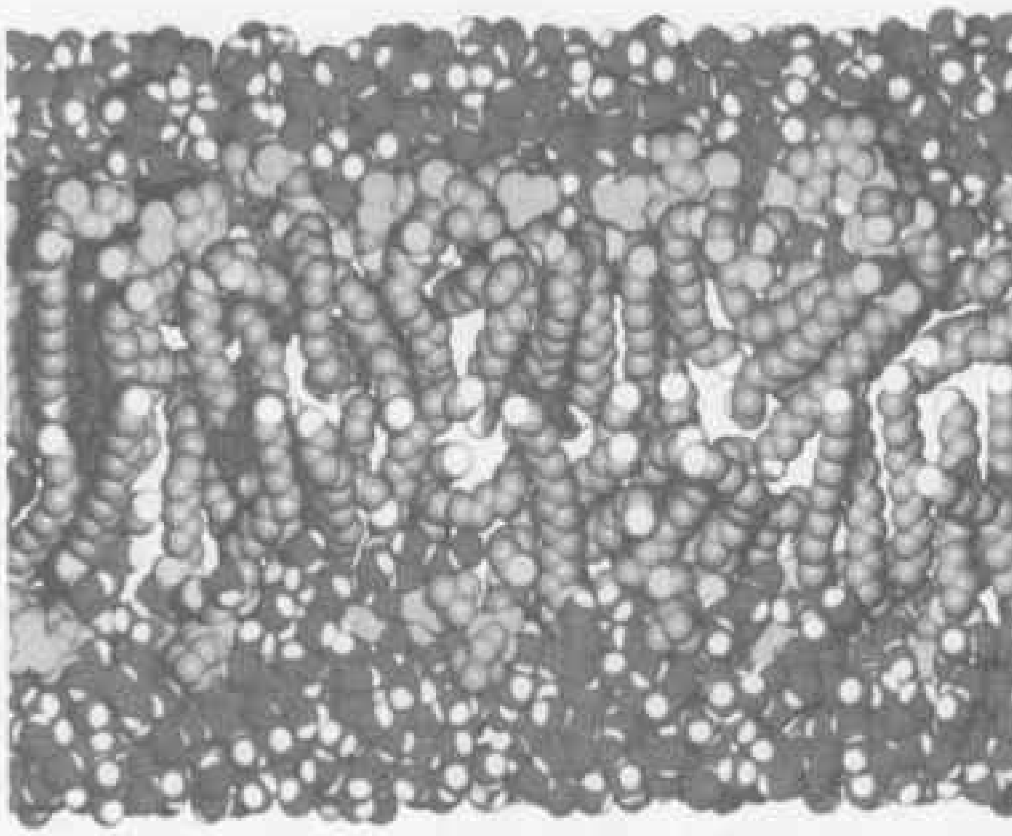
خصوصیات عمومی دولایه‌های لیپیدی

ملکول‌های فسفولیپید به راحتی جای خود را با ملکول‌های مجاور موجود در تک‌لایه‌های مجزا تعویض نموده و سبب انتشار جانبی سریع در صفحه غشاء می‌شوند (شکل ۲۰-۱۲). در هنگام تهیه لیپیدهای مختلف مربوط به غشاءهای ساختگی، لیپیدها به‌طور تصادفی بین تک‌لایه‌ها منتشر می‌شوند. چرخش حول پیوندهای کربن-کربن در زنجیرهای آسیل چرب رخ می‌دهد؛ در حقیقت، شدت بالاتر چرخش در نزدیکی انتهای متیلی وجود دارد که نتیجه آن حرکت بیشتر در مرکز نسبت به سطح دولایه لیپیدی است. به‌دلیل وجود فشارهای



شکل ۲۰-۱۲ حرکت اجزاء لیپیدی موجود در غشاءها.

1. Self-seal



شکل ۲۱-۱۲ مدلی از دولایه لیپیدی که در یک لحظه زمانی متوقف شده است. یک دولایه ساختگی از دی‌پالمیتیل فسفاتیدیل‌کولین احاطه‌شده توسط آب که توسط کامپیوتر مدل‌سازی شده است. رنگ اتم‌ها به صورت زنجیر C خاکستری (به غیر از C متیل انتهایی زرد و C گلیسرول قهوه‌ای)، استر O قرمز، P و O سبز، C و N کولین بنفش کمرنگ، O آب آبی تیره، و H آب آبی کمرنگ. هیدروژن‌های مربوط به لیپید حذف شده‌اند.

ترمودینامیکی حاصل از حرکت یک گروه سر باردار از میان هسته لیپیددوست، ملکول‌های لیپیدی مجزا به راحتی از یک تک‌لایه به تک‌لایه دیگر جابه‌جا (فلیپ-فلاپ[1]) نمی‌شوند. به‌علاوه، لیپیدها به راحتی از دولایه فرار نمی‌کنند. لذا دولایه‌های لیپیدی یک پایداری ذاتی دارند که در آن ملکول‌های مجزا سریعاً در تک‌لایه خود حرکت می‌کنند، ولی به راحتی با تک‌لایه مجاور تعویض نمی‌شوند.

تعامل لیپیدها در دولایه بسیار متفاوت از حالتی می‌باشد که در شکل ‎۱۹c-۱۲ نشان داده شده است. داخل دولایه لیپیدی بسیار مایع است و در حرکت دائم می‌باشد. زنجیرهای آسیل گلیسروفسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها که حرکت تصادفی دارند، با زنجیرهای موجود در تک‌لایه مخالف در هم می‌روند. چسبندگی در نزدیکی گروه‌های سر لیپیدی بیشتر است. کلسترول موجود در دولایه سیالیت را در نزدیکی سطح غشاء کاهش می‌دهد، زیرا کلسترول بیش از زنجیرهای آسیل فسفولیپیدها به داخل لایه امتداد نمی‌یابد. شکل ۲۱-۱۲ نمایش کامپیوتری از آرایش فسفولیپیدها در یک دولایه در یک لحظه زمانی است. چندین لایه از ملکول‌های آب منظم‌شده در سطح غشاءها بر روی محیط غشاء تأثیر می‌گذارند.

دو لایه لیپیدی ضرورتاً نسبت به ترکیبات غیرلیپیدی (برای مثال، کربوهیدرات‌ها) و ملکول‌های باردار نفوذناپذیر هستند، ولی در برابر ملکول‌های آبگریز خنثی نفوذپذیر می‌باشند. یون‌های معدنی (Na^+، K^+، Cl^-، و غیره)، ملکول‌های آلی باردار، و ماکروملکول‌های موجود در خارج لیپوزوم‌ها، به داخل لیپوزوم‌ها دسترسی پیدا نمی‌کنند. هرچند در هنگام تولید

1. Flip-flop

ارتباط بالینی ۱-۱۲

لیپوزم‌ها به‌عنوان حاملین داروها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک

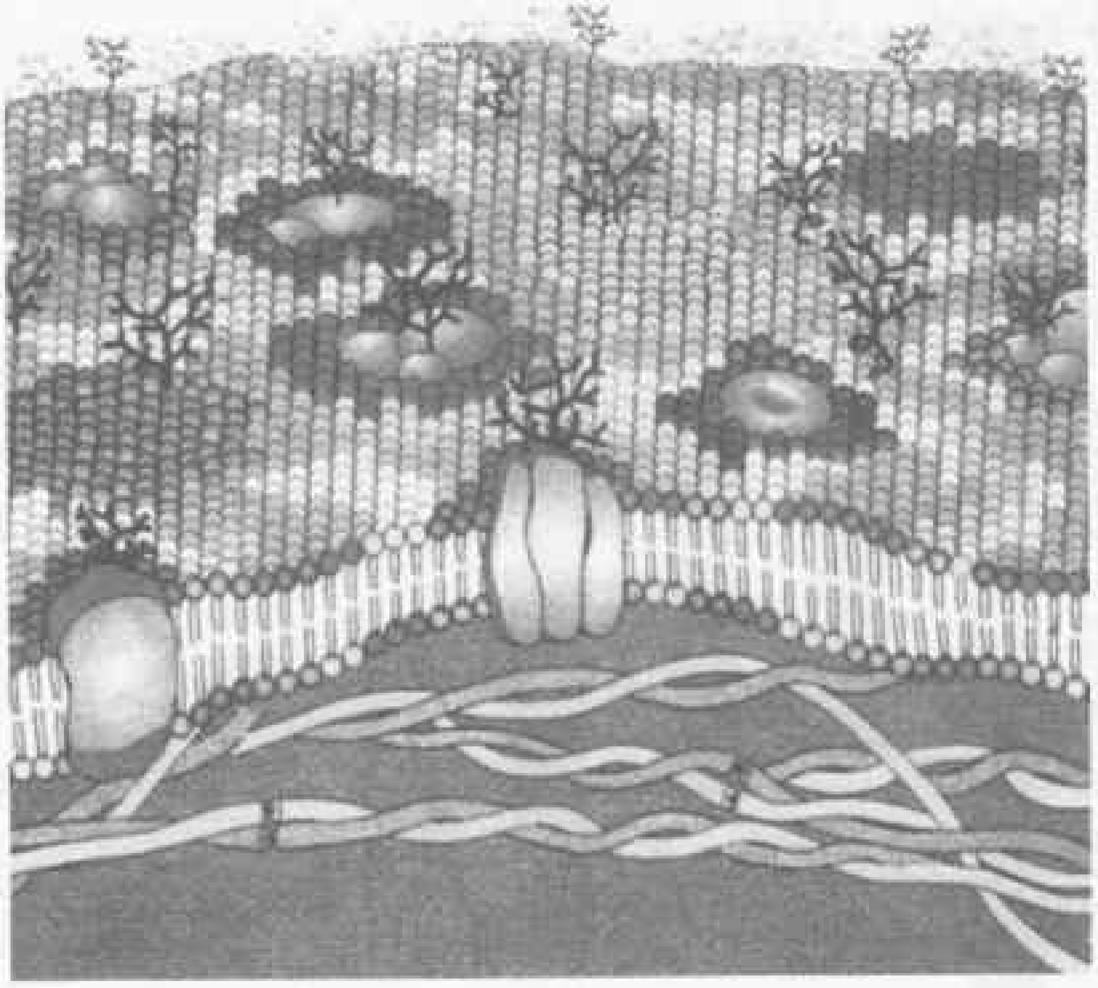
لیپوزوم‌ها برای تجویز انواع مختلفی از مواد درمانی جهت هدفمندسازی به اعضاء و بافت‌های اختصاصی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. هر دو نوع ترکیب آبدوست و آبگریز، اولی در محیط داخلی آبی و دومی در غشاء لیپوزومی، را می‌توان انتقال داد. لیپوزوم‌ها تولیدی از فسفولیپیدهای خالص، غیرسمی هستند و قابلیت تجزیه بیولوژیکی را دارند. لیپوزوم‌های کاتیونی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند که با بار سطحی غشاء سلول تعامل می‌کنند، و موارد دیگر دارای پروتئین‌های اختصاصی برای اتصال به گیرنده‌های غشاء سلولی اختصاصی می‌باشند. برداشت لیپوزوم‌ها را می‌توان از طریق ادغام با غشاء سلولی یا به‌واسطه آندوسیتوز انجام داد. مشخص شده است که لیپوزوم‌ها برای داروهایی کاربرد دارند که بسیار سریع متابولیزه می‌شوند. قرارگیری دارو در لیپوزوم‌ها سبب آزادسازی در طی یک دوره زمانی می‌شود، لذا اثربخشی آنها را افزایش می‌دهند. عوامل آنتی‌بیوتیک، ضد نئوپلاسم، ضد مالاریا، ضد ویروس، ضد قارچ و ضدالتهابی در هنگام تجویز در لیپوزوم‌ها موثر هستند. احتمال دارد بتوان لیپوزوم‌هایی را با شدت بالای ویژگی بافتی تهیه نمود، طوری که تحویل داروها و احتمالاً حتی جایگزینی‌های آنزیمی ممکن است با این تکنیک امکانپذیر باشند. لیپوزوم‌ها به عنوان وسایلی برای ارائه اسیدهای نوکلئیک به داخل سلول‌ها جهت ژن درمانی و درمان با ملکول‌های کوچک mRNA مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. در کاربرد دیگر، لیپوزوم‌های حاوی هموگلوبین تغلیظ‌شده به عنوان جایگزین گلبول‌های قرمز خون در انتقال خون مورد آزمایش قرار گرفته‌اند که تا حدودی همراه با موفقیت بوده است.

لیپوزوم، مواد غیرقابل نفوذ می‌توانند در محیط داخلی آبی بدام افتند. لذا هر دو محیط خارجی و داخلی را می‌توان دستکاری نمود، و خصوصیاتی نظیر توانایی در دفع ملکول‌ها، تعامل با مواد مختلف، و پایداری در شرایط مختلف را مورد ارزیابی قرار داد. لیپوزوم‌ها ابزار مهمی در مطالعه جنبه‌هایی از ساختمان و عملکرد غشاء طبیعی هستند. پروتئین‌هایی که از غشاءهای بیولوژیکی جدا می‌شوند، در داخل غشاءهای لیپوزومی قرار داده شده تا فعالیت آنها مورد مطالعه قرار گیرد. با موفقیت تا حدودی محدود، لیپوزوم‌ها با ترکیب لیپیدی و پروتئینی مختلف به‌عنوان جایگزینی برای گلبول‌های قرمز، جهت تحویل داروهای کپسول‌دار، و به‌عنوان ناقل برای ژن درمانی در حیوانات و انسان مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (ارتباط بالینی ۱-۱۲).

۴-۱۲ • ساختمان غشاءهای بیولوژیکی

مدل موزائیک غشاءهای بیولوژیک

تمامی غشاءهای پلاسمایی و داخل سلولی، دولایه‌های لیپیدی از لیپیدهای دوگانه‌دوست و کلسترول هستند که قسمت‌های آبگریز آنها طوری قرار گرفته‌اند که تماس با آب یا گروه‌های قطبی دیگر را به حداقل برسانند. گروه‌های سر قطبی در فصل مشترک محیط آبی قرار دارد. پروتئین‌ها در سطح انتشار یافته و یا در دولایه لیپیدی غوطه‌ور می‌باشند و می‌توانند به‌طور جانبی در **دریای لیپیدی** انتشار یابند. هر چند، سازماندهی ملکولی غشاءهای بیولوژیکی، شامل فشارهایی بر روی انتشار تصادفی لیپیدها و پروتئین‌ها در برخی دومن‌ها وجود دارد. شکل ۲۲-۱۲ مدلی از یک غشاء بیولوژیکی است که شدتی از سازماندهی را نشان می‌دهد.



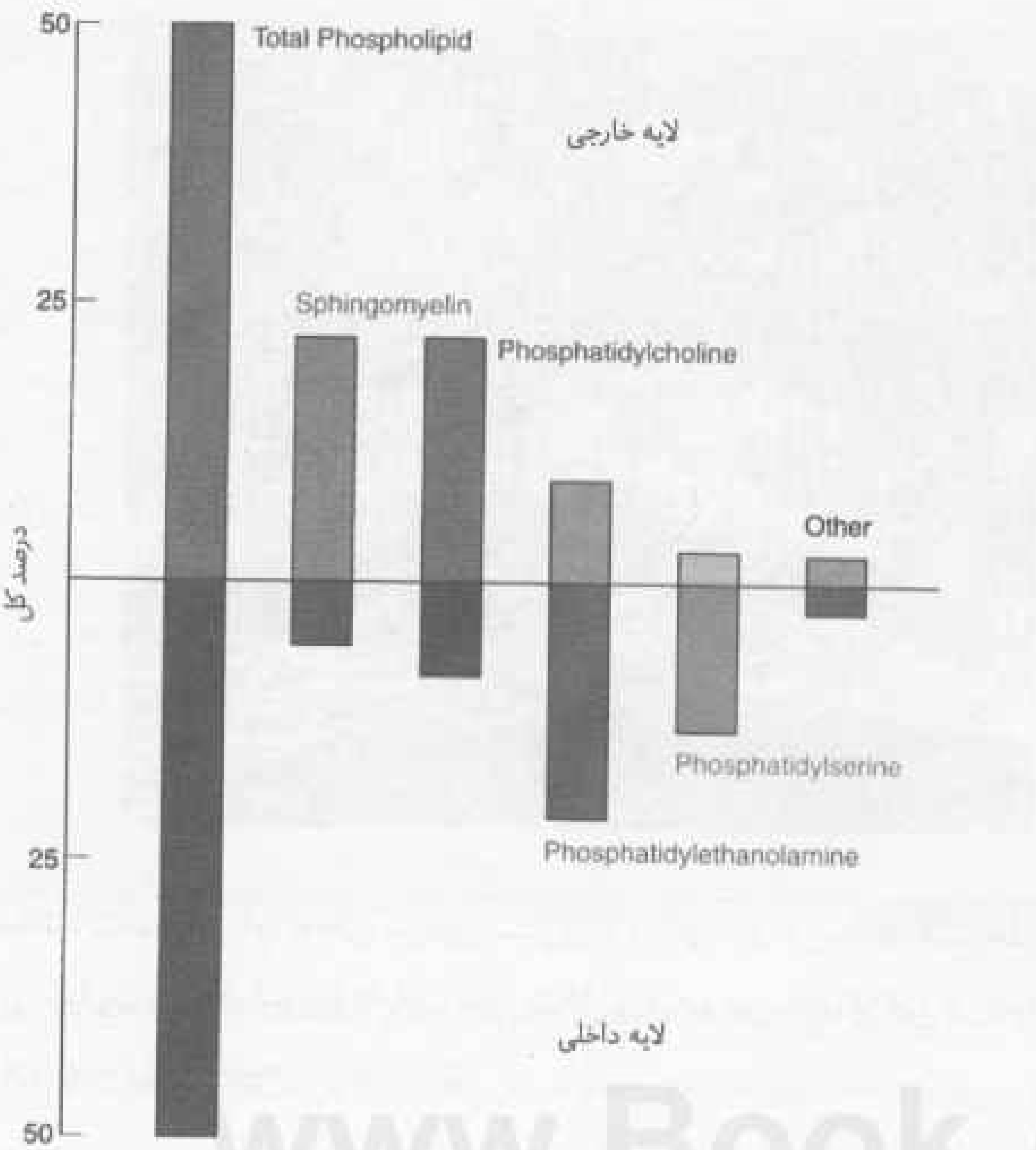
شکل ۲۲-۱۲   مدل یک غشاء پلاسمایی پستانداران. لیپیدهای مختلف می‌بایست بسیار تصادفی‌تر از حالت نشان داده شده باشند. پروتئین‌ها به صورت ساختمان‌های گلبولی (کروی) نشان داده شده‌اند و کربوهیدرات‌ها به شکل درخت‌های سیاه در سطح خارجی غشاء به پروتئین‌ها متصل شده‌اند. شبکه فیبری (رشته‌ای) موجود در زیر غشاء اشاره به اسکلت سلولی و ارتباط آن با غشاء دارد.

خصوصیات عمومی دولایه‌های لیپیدی بسیاری از ویژگی‌های مربوط به غشاءهای سلولی، شامل سیالیت، انعطاف‌پذیری که امکان تغییر شکل را فراهم می‌سازد، توانایی در خود-جوشی و نفوذناپذیری را تشریح می‌کنند.

لیپیدها انتشار نامتقارنی در غشاءها دارند

لیپیدها انتشار نامتقارنی در دولایه غشاءهای بیولوژیکی دارند. هر لایه یک ترکیب مختلف گلیسروفسفولیپیدها و اسفنگولیپیدها را دارد. انتشار نامتقارن لیپیدهای غشاء پلاسمایی گلبول قرمز انسانی در شکل ۲۳-۱۲ نشان داده شده است. اسفنگومیلین در لایه‌خارجی غالب است، در حالی‌که فسفاتیدیل اتانل‌آمین در لایه لیپیدی داخلی غالب می‌باشد. به دلیل میزان کم، فسفاتیدیل اینوزیتول‌ها در شکل ۲۳-۱۲ نشان داده نشده‌اند، ولی اساساً در لایه داخلی قرار دارند؛ برحسب بافت، این میزان متفاوت می‌باشد. انتشار کلسترول در عرض دولایه، نامعلوم می‌باشد. لیپیدهای موجود در غشاءهای داخل سلولی نیز انتشار نامتقارن، ولی نه با همان الگوی موجود در غشاء پلاسمایی، دارند. این عدم‌تقارن‌ها مسئول برخی تفاوت‌های فعالیتی موجود در دو لایه می‌باشد.

عدم‌تقارن لیپیدی در هنگام بیوسنتز غشاءها بر روی شبکه آندوپلاسمی برقرار می‌گردد. حرکت عرضی کاتالیزنشده (فلیپ-فلاپ) آهسته است، ولی رخ می‌دهد. عدم‌تقارن لیپیدها توسط **انتقال‌دهنده‌های لیپیدی** حفظ می‌شود که حرکت یک جهته لیپیدهای اختصاصی از یک لایه به‌لایه دیگر، گاهی در برابر شیب غلظتی آنها، را کاتالیز می‌کنند. زیرکلاسی از **انتقال‌دهنده‌های لیپیدی** وابسته به ATP، تحت عنوان **ترانس‌لوکازهای آمینوفسفولیپیدی یا فلیپازها**، که برای فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل اتانل‌آمین اختصاصی هستند، انتقال این



شکل ۲۳-۱۲ انتشار فسفولیپیدها بین لایه‌های داخلی و خارجی غشاء گلبول قرمز انسان. مقادیر درصد هر فسفولیپید موجود در غشاء را نشان می‌دهند. «other» اشاره به فسفاتیدیل اینوزیتول، فسفاتیدیل اینوزیتول ۴-فسفات، فسفاتیدیل اینوزیتول ۴، ۵-بیس‌فسفات و اسید فسفاتیدیک دارد.

آمینوگلیسرولیپیدها از لایه خارج سلولی به لایه سیتوپلاسمی را کاتالیز می‌کنند. این انتقال‌دهنده‌ها مسئول حفظ غلظت‌های پایین این فسفولیپیدها در لایه خارجی غشاهای پلاسمایی می‌باشند. انتقال‌دهنده وابسته به ATP با حرکت رو به خارج، تحت عنوان **فلاپاز**، برای فسفولیپیدها غیراختصاصی است. نوع سوم انتقال‌دهنده لیپیدی، **فسفولیپید اسکرمبلاز**، مخلوط‌سازی دوجهته فسفولیپیدها بین دو لایه را تسهیل نموده و به موجب آن سبب توزیع تصادفی فسفولیپیدها بین دولایه می‌شود. این انتقال‌دهنده از نظر فسفولیپیدها، غیراختصاصی است، وابستگی به ATP ندارد، و با افزایش Ca^{2+} داخل سلولی تحریک می‌شود. فسفولیپید اسکرمبلاز ۱[1] (PLSCR 1) می‌تواند به‌طور برگشت‌پذیر پالمیتیله-دپالمیتیله شود و حاوی یک جایگاه فسفریلاسیون توسط پروتئین کیناز C برای کنترل فعالیت می‌باشد (ص ۷۲۷). اسکرمبلازها نقش مهمی در آبشار انعقادی به‌واسطه سلول (ص ۱۳۰۹)، و شناسایی توسط سیستم رتیکولوآندوتلیال سلول‌های در حال مرگ (ص ۱۳۴۰) بازی می‌کنند. در هر دو پاسخ، حرکت فسفاتیدیل سرین از لایه داخلی به لایه خارجی منجر به در معرض قرارگرفتن فسفاتیدیل سرین در سطح خارج‌سلولی و تغییر در بار موجود در سطح می‌شوند.

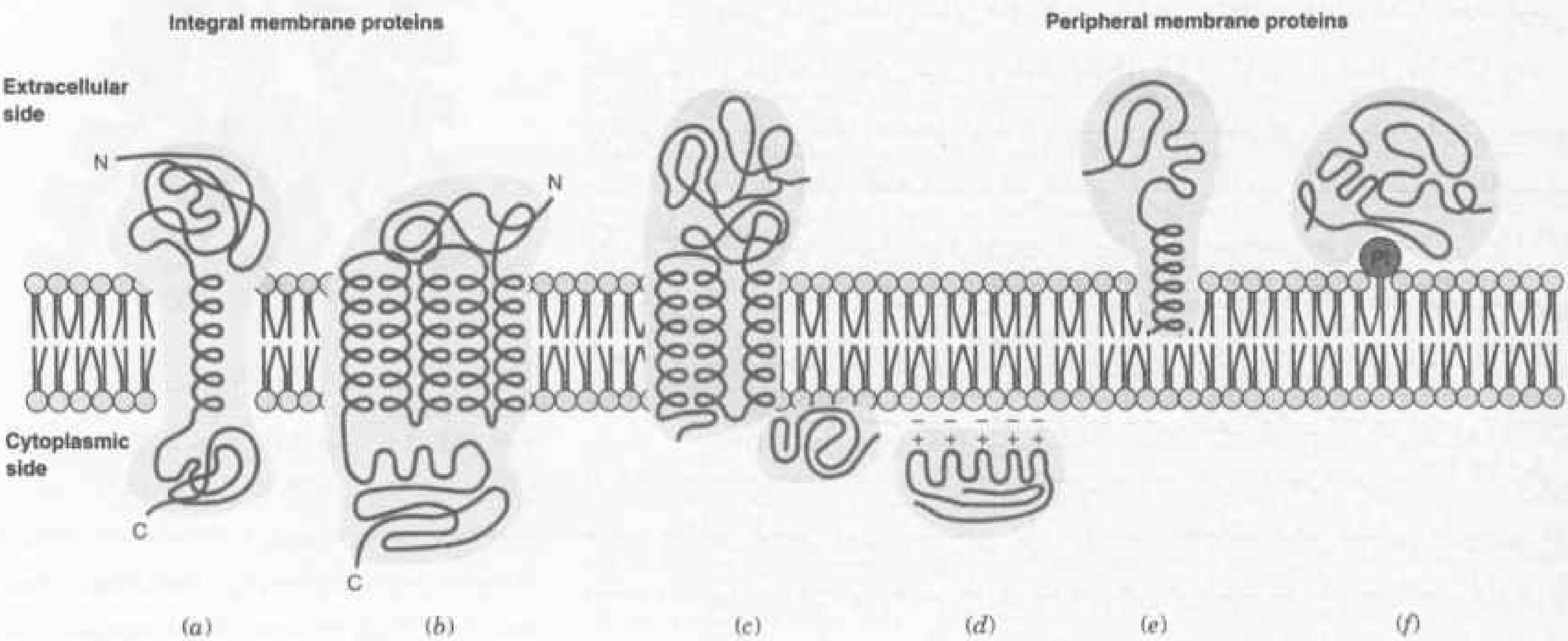
1. Phospholipid scramblase 1

پروتئین‌های غشایی داخلی

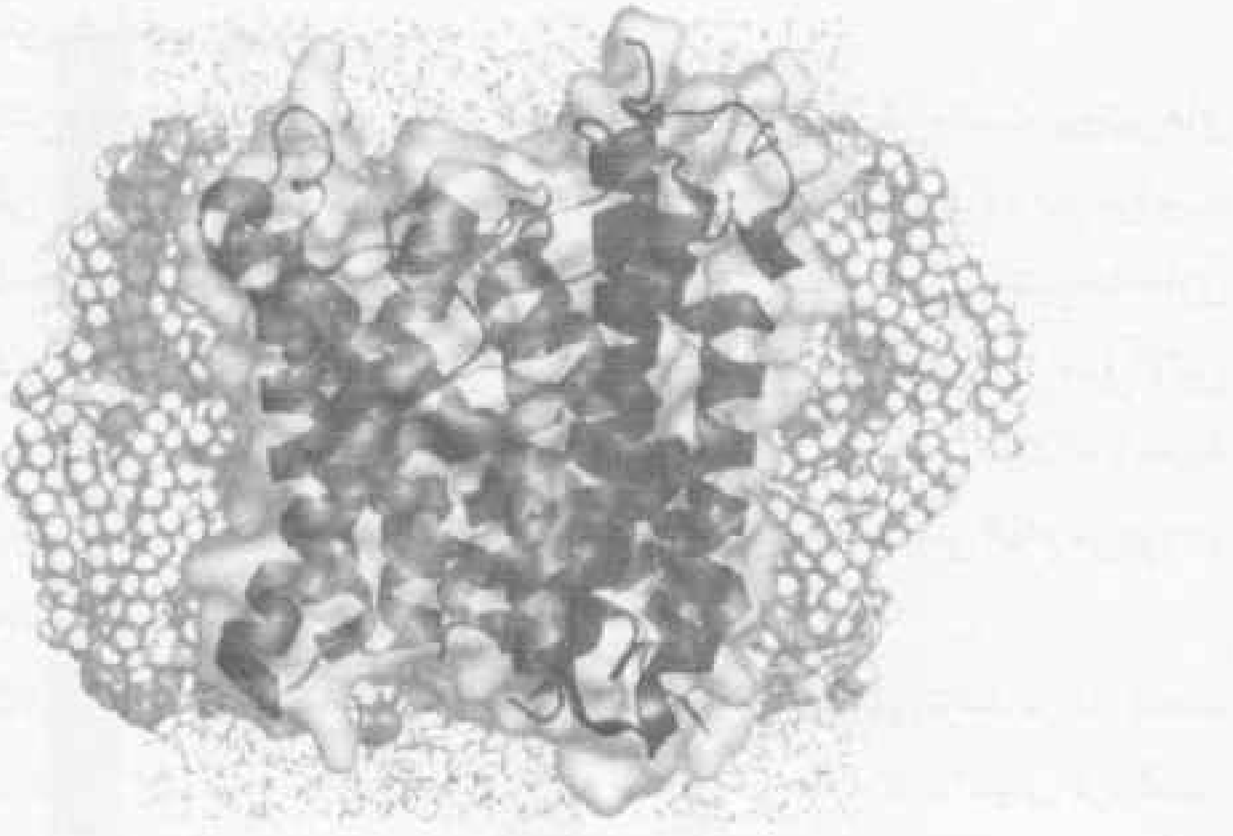
تعاملات پروتئین‌ها با غشاءهای بیولوژیک در شکل ۲۴-۱۲ شرح داده شده است. **پروتئین‌های غشایی داخلی** با یک موقعیت مشخص در داخل غشاء مدفون می‌شوند که این موقعیت به‌واسطه ساختمان اولیه آنها تعیین می‌گردد. **قطعات عرض‌غشایی** این پروتئین‌ها حاوی توالی‌های غنی از اسیدهای آمینه آبگریز نظیر لوسین، ایزولوسین، والین، و فنیل‌آلانین می‌باشند که در تماس با محیط لیپیدی هستند. برخی دومن‌های کروی بزرگی دارند که با محیط آبی موجود در دو سمت غشاء در تماس می‌باشند و برخی، به‌خصوص انواع موجود در غشاء پلاسمایی، گلیکوپروتئین هستند.

برحسب نوع پروتئین اختصاصی، دو انتهای آمینو و کربوکسیل می‌توانند در دو سمت مخالف یا هر دو در یک سمت غشاء وجود داشته باشند. در حالت اول، انتهای کربوکسیل اغلب در سمت سیتوپلاسمی قرار دارد. بسیاری از پروتئین‌های موجود در غشاءهای پلاسمایی و شبکه آندوپلاسمی یک فراوانی چهار برابر ریشه‌های لیزین و آرژینین دارای بار مثبت در سطح سیتوپلاسمی، در مقایسه با سطح خارج‌سلولی یا مجرایی، دارند. از حرکت عرضی (فلیپ-فلاپ) پروتئین‌های داخلی به‌واسطه حجم بزرگ آنها و همچنین به‌واسطه تعاملات ترمودینامیکی، ممانعت به‌عمل می‌آید.

قطعات عرض‌غشایی اکثر پروتئین‌های داخلی غشاء از نوع مارپیچ α هستند، ولی موتیف‌های لوله β نیز یافت می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲۴a-۱۲ نشان داده شده



شکل ۲۴-۱۲ **تعاملات پروتئین‌های غشایی با دولایه لیپیدی.** در این دیاگرام انواع مختلف اتصال پروتئین‌ها در یا به دولایه لیپیدی نشان داده شده است. (a) یک قطعه عرض‌غشایی. (b) چندین قطعه عرض‌غشایی. (c) اتصال به یک پروتئین اینتگرال. (d) اتصال الکترواستاتیک به دولایه لیپیدی. (e) اتصال با یک توالی از اسیدهای آمینه آبگریز انتهایی. (f) اتصال غیر-کووالان به یک فسفاتیدیل اینوزیتول (PI) در غشاء.

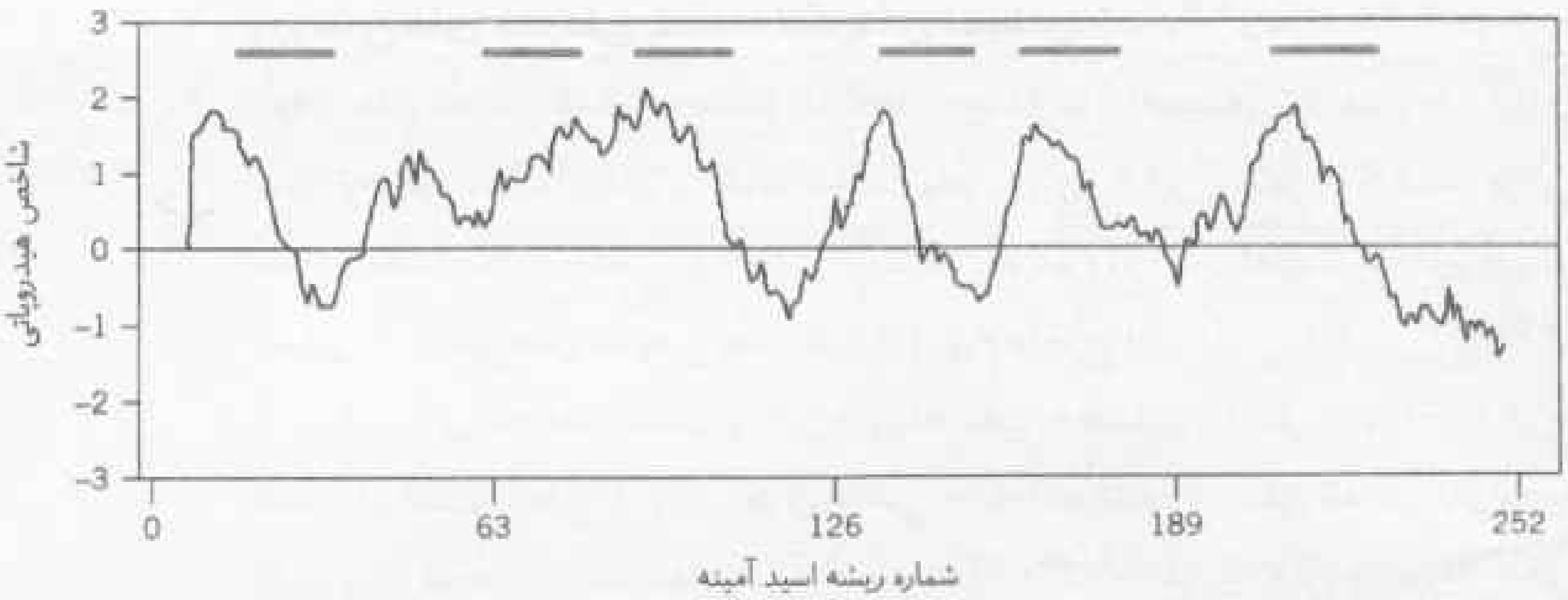


شکل ۲۵-۱۲ **پروتئین غشایی داخلی.** در این شکل یک زیرواحد پروتئین انتقال‌دهنده آمونیومی تریمری پروتئین AmtB از *E.coli* نشان داده شده است که در داخل دولایه لیپیدی فرو رفته است. به تعامل لیپید-پروتئین، و بخش‌های آبی پری‌پلاسمی (بالا) و داخل‌سلولی (پایین) موجود در هر دو سمت غشاء توجه کنید.

است، برخی پروتئین‌ها حاوی یک قطعه عرض‌غشایی مارپیچی α هستند. **گلیکوفورین** با ۱۳۱ ریشه، نمونه‌ای است که در غشاء پلاسمایی گلبول‌های قرمز انسان وجود دارد؛ توالی عرض‌غشایی متشکل از ریشه‌های ۹۱-۱۷۳است. انتهای آمینو در خارج سلول قرار داشته و حاوی اولیگوساکاریدهای مختلفی شامل شاخص‌های گروه‌خونی ABO و MN می‌باشد؛ از نظر وزنی، گلیکوفورین حاوی ۶۰٪ کربوهیدرات است. **اینتگرین‌ها** نیز یک قطعه عرض غشایی دارند؛ این خانواده فراگیر پروتئین‌ها، سیتوپلاسم را به ماتریکس خارج‌سلولی متصل نموده (ص ۴۹۸) و پیام‌رسانی عرض‌غشایی را در هر دو جهت وساطت می‌کند.

سایر پروتئین‌های داخلی توالی‌های عرض‌غشایی متعددی دارند که با ایجاد قوس چندین بار از دولایه لیپیدی عبور می‌کنند (شکل ۲۴b-۱۲ و c). شکل ۲۵-۱۲ چنین پروتئینی را تشریح می‌کند؛ به تعامل لیپید با پروتئین و بخش‌های آبی موجود در هر دو سمت غشاء توجه کنید. تعداد قطعات عرض‌غشایی فرضی با تعیین نمودار شدت خاصیت آبگریزی[1] هر ریشه اسید آمینه موجود در پروتئین مشخص می‌شود (ص ۱۱۹). توالی‌هایی که نسبت بالای اسیدهای آمینه آبگریز را دارند، وجود یک قطعه عرض‌غشایی را مطرح می‌کنند. نمودار هیدروپاتی (آبگریزی) آکواپورین، یک پروتئین داخلی غشاء، در شکل ۲۶-۱۲ نشان داده شده است؛ این نمودار وجود شش توالی عرض‌غشایی فرضی را نشان می‌دهد. براساس آنالیز اسیدهای آمینه پروتئین یا آنالیز ژن، پروتئین‌هایی با ۲ تا ۲۴ توالی عرض‌غشایی فرضی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. قطعات عرض‌غشایی مارپیچی α متعدد یک پروتئین داخلی اغلب طوری سازماندهی می‌شوند که یک ساختمان لوله‌ای را به‌وجود آورد که می‌تواند به‌عنوان راه عبوری برای حرکت ملکول‌ها در میان غشاء عمل کند (شکل ۲۷-۱۲). کانال یونی گلبول‌های قرمز انسان یک کانال لوله‌ای را به‌وجود آورند (ص ۶۶۶) که تبادل Cl^- و HCO_3^- را در عرض غشاء وساطت می‌کند.

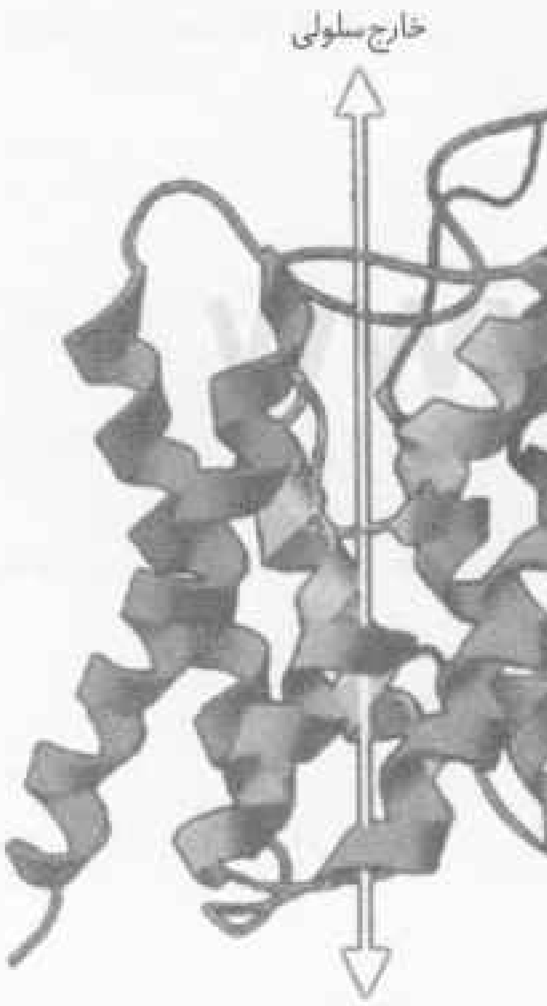
1. Hydrophobicity



شکل ۲۶-۱۲ **نمودار هیدروپاتی اکواپورین ۱ از اریتروسیت‌های انسانی.** شاخص هیدروپاتی برای یک اسید آمینه، میزانی است که تمایل آبگریزی و آبدوستی آن را نشان می‌دهد. هرچه این میزان مثبت‌تر باشد، اسید آمینه آبگریزتر است؛ یک میزان مثبت نشانه خوبی برای تعیین میزان تمایل اسید آمینه به محیط آبی است. قطعاتی از پروتئین که مقادیر بیشتر اسیدهای آمینه آبگریز را دارند، به صورت قطعات عرض‌غشایی احتمالی در نظر گرفته می‌شوند.

این کانال دو دومن اصلی دارد: یک دومن آبگریز انتهای آمینو در سمت سیتوپلاسمی غشاء همراه با جایگاه‌های اتصالی برای **آنکرین**، پروتئینی که اسکلت سلولی را به سایر پروتئین‌های سیتوپلاسمی متصل می‌کند، و یک دومن ۵۰۹ اسید آمینه‌ای با ۱۲ توالی عرض غشایی. با تعداد قطعات عرض‌غشایی زوج، انتهای کربوکسیل نیز در سمت سیتوپلاسمی قرار دارد. یک موتیف معمول پروتئین‌های داخلی، حاصل اولیگومریزاسیون منومرهای یکسان (کمپلکس‌های هُمومریک) و اولیگومریزاسیون منومرهای مختلف (کمپلکس‌های هترومریک) می‌باشد.

پروتئین‌های داخلی غشاء دومن‌های اختصاصی برای اتصال به لیگاند، برای فعالیت کاتالیتیک یا انتقالی، و برای اتصال کربوهیدرات دارند. وجود لیپیدهای اتصال‌یافته و جایگاه‌های اختصاصی برای ملکول‌های آب، وجود یک شدت بالای تنوع ساختمانی و عملکردی را مطرح می‌کند. اینها ساختمان‌های سختی نیستند و شکل آنها در غشاء می‌تواند از طریق تعامل با سایر پروتئین‌ها و ملکول‌های کوچک تغییر کند. این اثرات تعدیل‌کننده لیپیدها بر روی یک پروتئین ممکن است انعکاسی از تغییر در نظم و سیالیت غشاء و همچنین یک اثر مستقیم بر روی فعالیت پروتئین باشد. بسیاری از پروتئین‌های داخلی از طریق تعاملات غیرکووالان بین گروه‌های سر باردار و همچنین دم آبگریز، به لیپیدهای اختصاصی اتصال می‌یابند. مثال‌های مربوط به تأثیر لیپیدها بر روی فعالیت، شامل نیاز D−β− هیدروکسی‌بوتیرات دهیدروژناز (ص ۹۴۱) به فسفاتیدیل کولین برای فعالیت، و تثبیت کمپلکس‌های زنجیر تنفس سلولی توسط کاردیولیپین (ص ۶۱۹) می‌باشند. حداکثر فعالیت دی‌آسیل‌گلیسرول کیناز همراه با فسفاتیدیل کولین دارای زنجیرهای ۱۸ کربنه حاصل می‌شود و کلسترول در فعالیت پمپ‌های یونی غشایی مختلف و گیرنده‌های استیل‌کولین نقش دارد.



شکل ۲۷-۱۲ **قطعات متعدد عرض‌غشایی مارپیچی α.** مدل روبانی منومر AQP1 گلبول قرمز انسانی. چندین قطعه عرض‌غشایی مارپیچی α یک ساختمان لوله‌ای را به‌وجود می‌آورد. انتهای آمینو آبی و انتهای کربوکسی قرمز است. شش مارپیچ کج‌شده عبورکننده از عرض غشاء، دو نیم‌منفذ (قوس‌هایی با مارپیچ‌های کوتاه- سیان و نارنجی) را احاطه می‌کنند که در مرکز دولایه به یکدیگر می‌رسند. پیکان سفید کانال آبی را در میان پروتئین نشان می‌دهد.

پروتئین‌های محیطی غشاء: لنگرهای لیپیدی

پروتئین‌های محیطی غشاء در سطح غشاءها وجود دارند و اغلب می‌توان به راحتی آنها را بدون تخریب دولایه لیپیدی برداشت نمود. ارتباط بسیاری از این پروتئین‌ها با غشاء موقتی است و یک اتصال و جدایی چرخه‌ای را دارند. این موضوع در کنترل فعالیت آنها مؤثر است. بسیاری از پروتئین‌های محیطی غشاء در تبدیل پیام داخل سلولی نقش دارند (ص ۶۸۸).

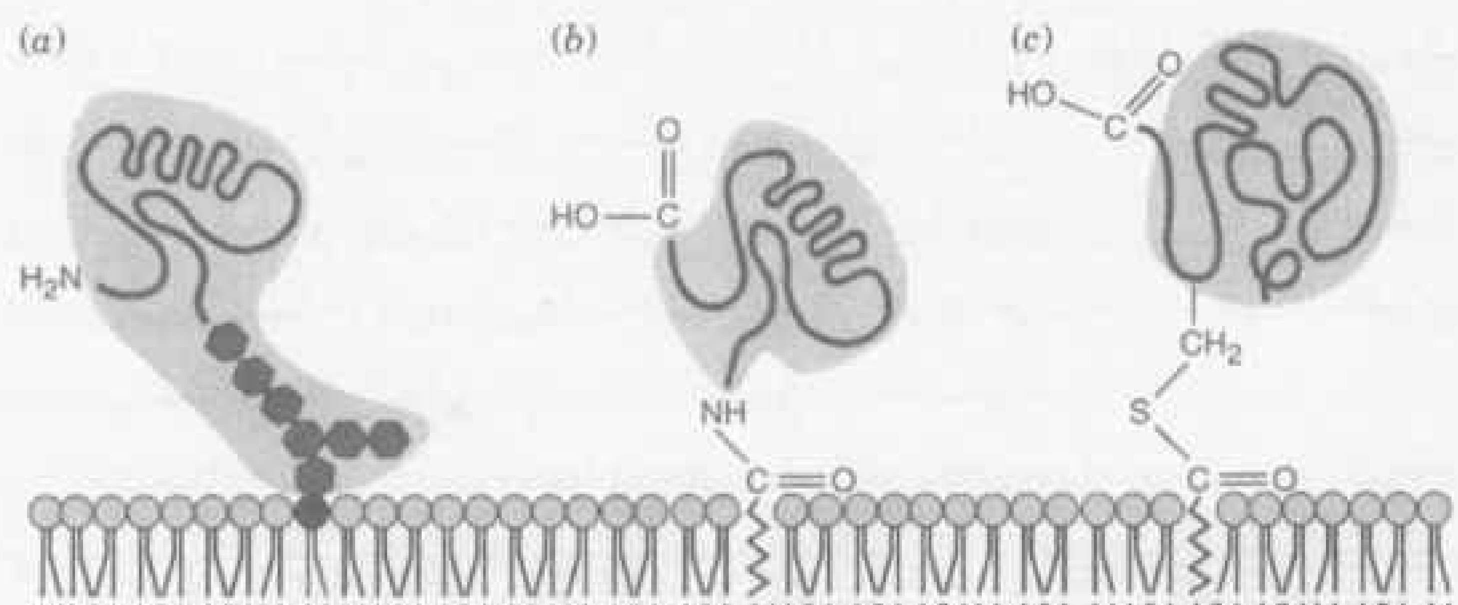
روش‌های مختلف اتصال پروتئین‌های محیطی به غشاء در شکل *c-f* ۲۴-۱۲ شرح داده شده است. برخی به پروتئین‌های داخلی غشاء اتصال دارند، نظیر اتصال آنکرین به کانال یونی موجود در گلبول‌های قرمز (شکل ۲۴*c*-۱۲). فسفولیپیدهای دارای بار منفی غشاءها با نواحی دارای بار مثبت پروتئین‌ها تعامل نموده و تولید اتصالات الکترواستاتیک می‌کنند (شکل ۲۴*d*-۱۲)؛ در برخی موارد، Ca^{2+} اتصال را وساطت می‌کند. تعدادی از پروتئین‌های محیطی حاوی توالی‌های کوتاهی از اسیدهای آمینه آبگریز در یک انتها هستند که به عنوان یک لنگر غشایی عمل می‌کند (شکل ۲۴*e*-۱۲). سایر پروتئین‌های محیطی غشاء یک دومن حفظ‌شده اختصاصی دارند که به‌طور غیرکووالان به گروه سر اینوزیتول ۳-فسفات فسفاتیدیل اینوزیتول ثابت‌شده در غشاء اتصال می‌یابد (شکل ۲۴*f*-۱۲). برخی پروتئین‌ها اشکال اتصالی متعدد مختلفی دارند.

تعدادی از پروتئین‌های محیطی غشاء اتصال کووالان به لیپیدی دارند که خود در داخل غشاء لیپیدی قرار گرفته است، نتیجه لنگراندازی[1] پروتئین به غشاء می‌باشد. انواع مختلف لنگرهای غشایی در جدول ۳-۱۲ و شکل ۲۸-۱۲ نمایش داده شده‌اند. یکی از این لنگرها، مستلزم فسفاتیدیل اینوزیتول (شکل ۸-۱۲ را ببینید) است که به یک **گلیکان** حاوی اتانل‌آمین، فسفات، مانوز، مانوز، مانوز و گلوکزآمین اتصال می‌یابد (ص ۸۹۱). این گلیکان از طریق اتانل‌آمین، اتصال کووالان به انتهای کربوکسیل یک پروتئین دارد (شکل ۲۸*a*-۱۲)، و گلوکزآمین اتصال کووالان به فسفاتیدیل اینوزیتول دارد. گروه‌های آسیل چرب فسفاتیدیل اینوزیتول در داخل غشاء لیپیدی قرار داده می‌شوند. این شکل اتصال را لنگر **گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول**[2] **(GPI)** گویند؛ به‌نظر می‌رسد که گروه‌های آسیل چرب برای پروتئین‌های مختلف اختصاصی هستند. آزادسازی و اتصال مجدد پروتئین به این لنگر تحت کنترل قرار داد که امکان تنظیم فعالیت پروتئین را فراهم می‌سازد. یک فسفولیپاز C اختصاصی فسفاتیدیل اینوزیتول، هیدرولیز پیوند فسفات-اینوزیتول را هیدرولیز کرده و منجر به آزادسازی پروتئین می‌شود. لنگر GPI همچنین موقعیت پروتئین بر روی غشاء را کنترل می‌کند. بیش از ۵۰ پروتئین شامل آنزیم‌ها، آنتی‌ژن‌ها، و پروتئین‌های چسبندگی سلولی نیز چنین اتصالاتی را دارند (جدول ۳-۱۲). لنگر GPI طی دوره تکامل حفظ شده است.

1. Anchoring   2. Glycosylphosphatidylinositol

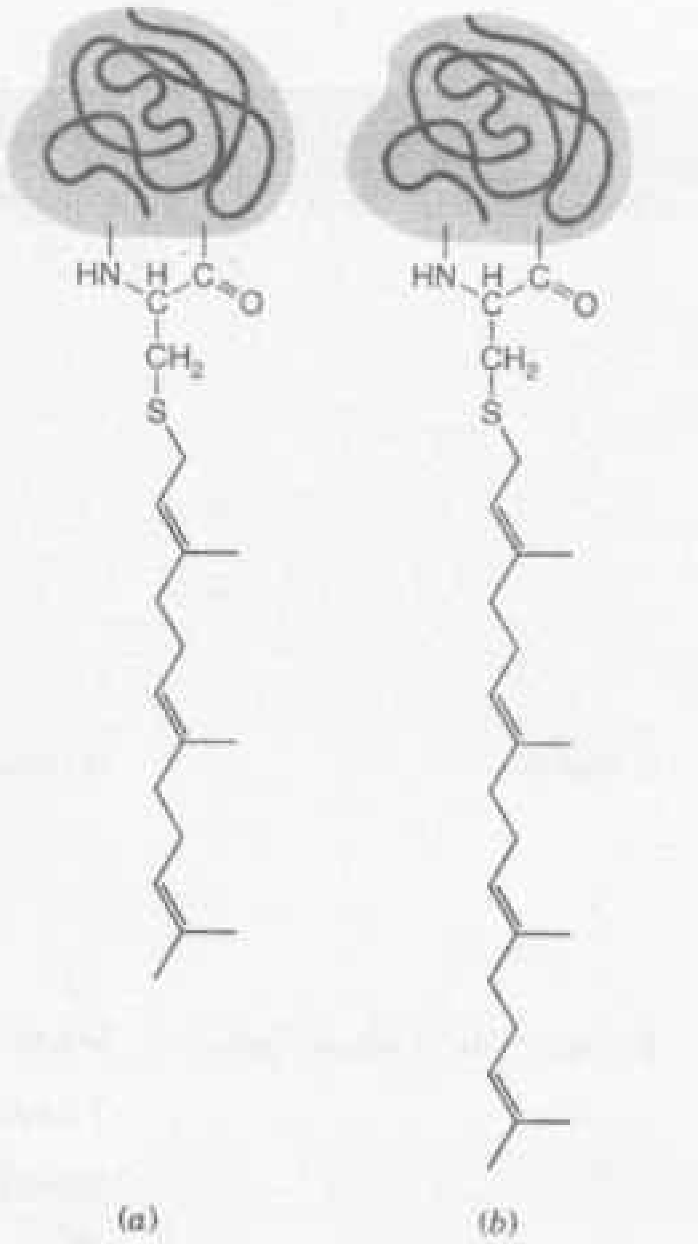
جدول ۳-۱۲ • انواع لنگرهای لیپیدی

نوع لنگر	لیپید درگیر در اتصال	اتصال	پروتئین‌های نمونه
Phosphatidyl inositol (GPI)	Phosphatidylinositol	Glycan (ethanolamine, phosphate, mannose, mannose, mannose, and glucosamine)	Acetylcholine esterase Alkaline phosphodiesterase Carbonic anhydrase Cell-cell adhesion molecules Cell surface hydrolases Lipoprotein lipase Scrapie prion protein Surface antigens
Myristoyl	Myristic acid (C_{14})	Amide linkage at N-terminal glycine	β–Adrenergic receptor c-CAMP protein kinase Insulin receptor α-Subunit of G Protein
Thioester and hydroxy ester	Myristic acid (C_{14}) Palmitic acid (C_{16}) Stearic acid (C_{18}) Oleic acid (C_{18})	—SH or —OH of Cysteine Serine Threonine	G-protein-coupled receptors Transferrin receptor
Thioether-linked	Isoprenoid lipid Farnesyl (C_{15}) Gerany lgeranyl (C_{20}) Dolichol	Cysteine	Many GTP-binding proteins Nuclear lamins Protein kinases Protein phosphatases



شکل ۲۸-۱۲ انواع لنگرهای لیپیدی برای اتصال پروتئین‌های غشایی. (a) لنگر گلیکوزیل‌فسفاتیدیل‌اینوزیتول (GPI). (b) لنگر میریستیل. (c) لنگر تیواستری.

لنگرهای آسیلی با اتصال تیواستری (جدول ۳-۱۲) مستلزم اتصال کووالان اسید میریستیک (۱۴ کربنه)، اسید پالمیتیک (۱۶ کربنه)، اسید استئاریک (۱۸ کربنه)، و اسید اولئیک (۱۸ کربنه)، به یک سیستئین می‌باشند. گروه‌های آسیل به عنوان لنگرهای غشایی عمل می‌کنند (شکل ۲۸c-۱۲) و آسیلاسیون به طرق مختلف بر روی فعالیت، موقعیت



شکل ۲۹-۱۲ لنگر تیواتری ایزوپرنوئیدی برای اتصال پروتئین‌های غشایی. *(a)* لنگر فارنسیل. *(b)* لنگر ژرانیل ژرانیل.

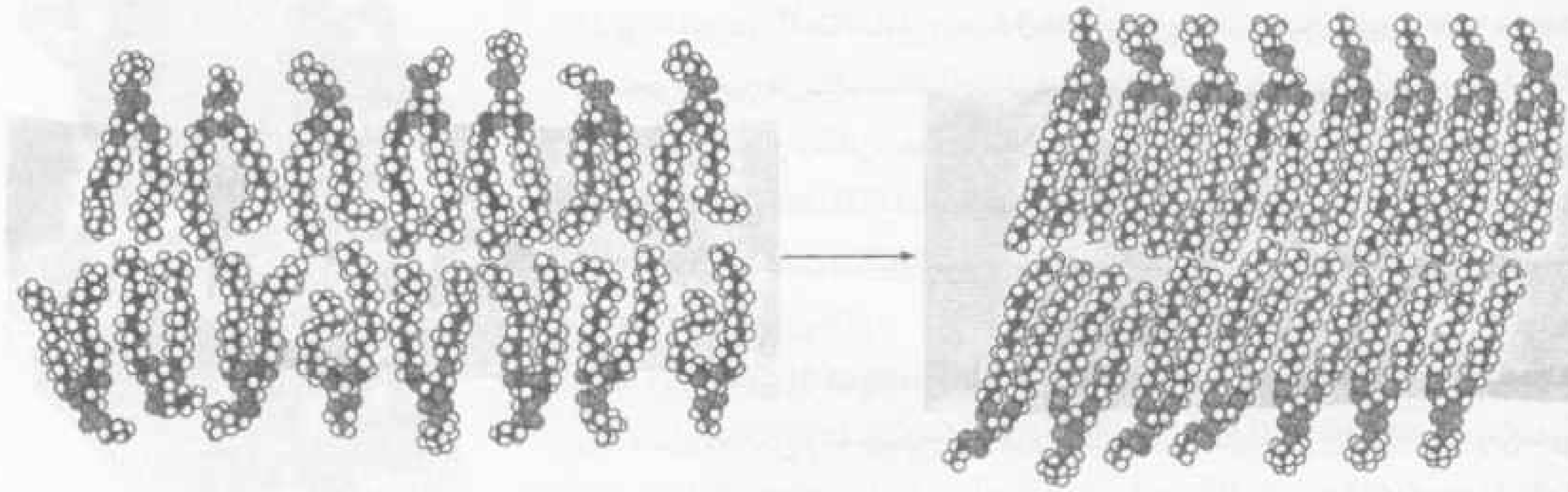
تحت‌سلولی، پایداری، و تعامل با سایر پروتئین‌های پروتئین مورد نظر تأثیر می‌گذارند. این گروه آسیل اغلب در نزدیکی یک اسید میریستیک با اتصال آمیدی به گلیسین انتهای آمینو یک سیستئین پرنیله در انتهای کربوکسیل یافت می‌شود. فعالیت پروتئین آسیله تحت کنترل یک چرخه پویای آسیلاسیون و دآسیلاسیون قرار دارد. این پروتئین‌های آسیله به‌عنوان ملکول‌های پیام‌رسان عمل می‌کنند و در انتقال وزیکولی و سیناپس عصبی نقش دارند.

شکل دیگر اتصال لیپیدی یک پروتئین محیطی، مستلزم یک اتصال تیواتری بین پروتئین و لیپیدهای ایزوپرنوئید فارنسیل (کربن ۱۵) یا ژرنیل‌ژرانیل (کربن ۲۰) می‌باشد (شکل ۲۹-۱۲). اتصالات تحت عنوان **پروتئین‌های پرنیله CAAX** مورد اشاره قرار می‌گیرند، زیرا ایزوپرنوئید به یک ریشه سیستئین موجود در توالی ریشه Cys–آلیفاتیک–آلیفاتیک–هر اسید آمینه نزدیک به انتهای کربوکسیل، اتصال دارد. X به‌شکل واضحی مشخص می‌کند که کدام ایزوپرنوئید اتصال یابد؛ برای اتصال فارنسیل نیاز به گلوتامین، متیونین یا سرین می‌باشد و برای ژرانیل‌ژرانیل نیاز به لوسین می‌باشد. پروتئین‌های پرنیله CAAX معمولاً متصل به سطح سیتوپلاسمی هستند.

لیپیدها و پروتئین‌ها در لایه‌های غشاء انتشار می‌یابند

تعاملات موجود در بین لیپیدهای مختلف و بین لیپیدها و پروتئین‌ها بسیار پیچیده و پویا هستند. سیالیت در بخش لیپیدی غشاءها وجود دارد و لیپیدها و پروتئین‌های مجزا سریعاً در عرض سطح غشاءها حرکت می‌کنند. در غشاءهای لیپیدی ساختگی، شدت سیالیت وابسته به درجه حرارت است. در درجه حرارت‌های پایین، لیپیدها در وضعیت ژل–کریستالی قرار دارند که حرکت آنها را محدود می‌کند؛ با افزایش درجه حرارت، تغییر فاز رخ داده که همراه با افزایش سیالیت می‌باشد (شکل ۳۰-۱۲). در غشاءهای بیولوژیکی، به‌جای یک تغییر از وضعیت ژلی–کریستالی به مایع–کریستالی، مخلوطی از فازهای مایع– منظم و مایع–نامنظم وجود دارد که احتمالاً وابسته به ترکیب لیپید و پروتئین می‌باشد. درحقیقت، تعاملات بین لیپیدها و پروتئین‌ها منجر به تغییراتی در وضعیت‌های منظم–نامنظم در سرتاسر غشاء و تفاوت‌هایی در سیالیت نواحی مختلف می‌شود.

غشاءهای دارای گلیسروفسفولیپیدهای حاوی گروه‌های آسیل چرب زنجیر کوتاه و غیراشباع، سیالیت بیشتری دارند. پیوندهای دوگانه سیس در اسیدهای چرب غیراشباع فسفولیپیدها منجر به خمیدگی در زنجیر هیدروکربنی می‌شود؛ این حالت مانع تراکم زیاد زنجیرها شده و پاکت‌هایی از نواحی آبگریز را بوجود می‌آورند. کلسترول با ساختمان حلقوی پهن و سخت خود، فنری‌شدن زنجیرهای اسید چرب راکاهش داده و سیالیت را پایین می‌آورد. اهمیت بالینی کلسترول خون بالا بر روی سیالیت غشاءهای سلولی در ارتباط بالینی ۲-۱۲ شرح داده شده است. Ca^{2+} به دلیل تعامل خود با گروه‌های سر دارای بار منفی فسفولیپیدها که سبب کاهش دافعه بین گروه‌های قطبی و افزایش تراکم ملکول‌های لیپیدی می‌شود،



شکل ۳۰-۱۲ ساختمان دولایه لیپیدی در بالا (حالت نامنظم) و پایین (حالت منظم) درجه حرارت انتقالی.

ارتباط بالینی ۲-۱۲

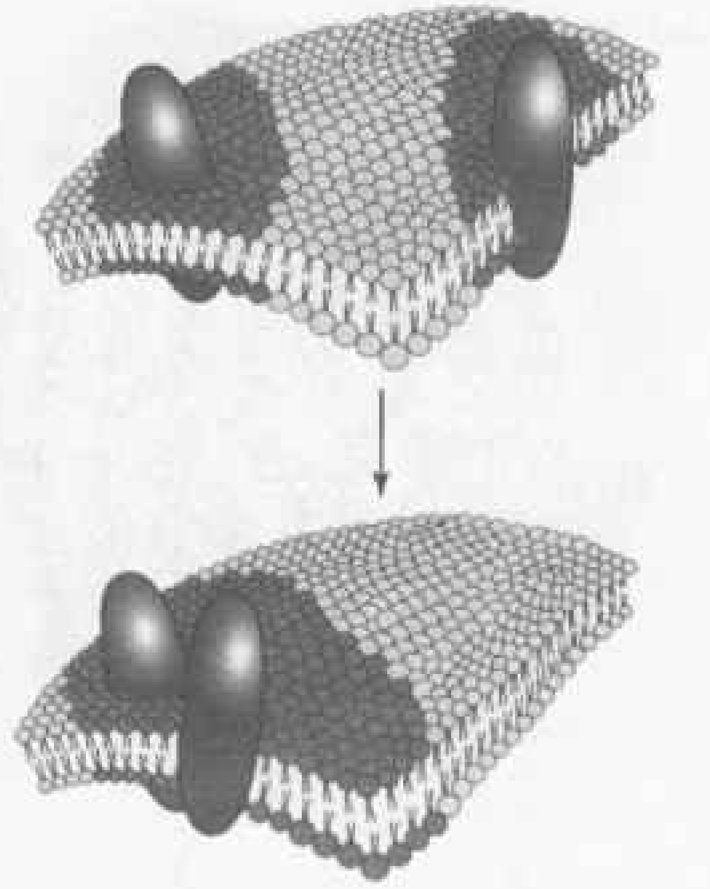
ناهنجاری‌های مربوط به سیالیت غشاء در بیماری‌ها

سیالیت غشاء می‌تواند فعالیت آنزیم‌های متصل به غشاء و عملکردهایی نظیر فاگوسیتوز و رشد و مرگ سلولی را کنترل کند. یکی از عوامل اصلی در سیالیت غشاء پلاسمایی در موجودات عالی و پستانداران، وجود کلسترول است. با افزایش محتوای کلسترول، دولایه لیپیدی در سطح خارجی خود جامدتر شده و در قسمت مرکزی آبگریز مایع‌تر می‌شود. غشاء گلبول‌های قرمز افراد مبتلا به کم‌خونی سلول خاردار، محتوای بالای کلسترول را دارند، شکل گلبول خاردار است، و این سلول‌ها به شکل زودرس در طحال تخریب می‌شوند. این وضعیت در بیماری کبدی شدید نظیر سیروز الکلی مشاهده می‌گردد. محتوای کلسترول ۲۵٪ تا ۶۵٪ افزایش یافته و سیالیت غشاء کاهش می‌یابد. برای عبور از مویرگ‌ها، غشاء گلبول‌های قرمز نیاز به سیالیت بیشتری دارند. افزایش کلسترول غشاء پلاسمایی سلول‌های دیگر منجر به افزایش کلسترول غشاء داخل سلولی می‌شود که این نیز بر روی سیالیت آنها تأثیر می‌گذارد. اثر مسمومیت‌زایی اتانل بر روی سیستم عصبی احتمالاً حاصل تغییر سیالیت غشاء، تغییر گیرنده‌ها و کانال‌های غشایی است. افراد مبتلا به آبتالیپوپروتئینمی افزایش در محتوای اسفنگومیلین و کاهش در فسفاتیدیل‌کولین موجود در غشاءهای سلولی همراه با کاهش سیالیت غشاء را دارند.

تغییر در سیالیت غشاء به‌عنوان یک عامل در کمبود لسیتین: کلسترول آسیل‌ترانسفراز، فشار خون بالا، و بیماری آلزایمر مطرح شده است. با بهبود تکنیک‌های اندازه‌گیری و ارزیابی سیالیت غشاء سلولی، برخی تظاهرات پاتولوژیکی بیماری ممکن است براساس تغییر در ساختمان و عملکرد غشاء شرح داده شود.

سیالیت غشاءها را کاهش می‌دهد. در نتیجه لیپیدها به‌صورت دستجاتی تجمع می‌یابند و سیالیت کاهش پیدا می‌کند. توزیع نامتقارن فسفو- و اسفنگولیپیدها منجر به تفاوت در سیالیت دو لایه می‌شود. زنجیرهای هیدروکربنی لیپیدها انعطاف‌پذیر هستند و شدت بالای سیالیت را در مرکز آبگریز نسبت به نواحی نزدیک‌تر به سطح ایجاد می‌کنند که در آن فشارهای بیشتری از طرف قسمت‌های سخت‌تر زنجیرهای هیدروکربنی وجود دارد.

ترکیب زنجیرهای آسیل چرب فسفولیپیدها و کلسترول موجود در غشاءها توسط رژیم غذایی، تغییر در Ca^{2+} سلولی، رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی تغییر می‌یابد که منجر به تغییر در سیالیت غشاء می‌شود. داروهای بیهوشی سیالیت غشاء را در آزمایشگاه افزایش می‌دهند و ممکن است در بدن از طریق اثر بر روی سیالیت غشاء سلول‌های اختصاصی عمل کنند. تغییر در سیالیت غشاءها در هیپرکلسترولمی، فشار خون بالا، دیابت قندی، چاقی، الکلیسم، شیزوفرنی، و بیماری آلزایمر گزارش شده است.



شکل ۳۱-۱۲ نمایش شماتیک کلک‌های غشاء. این دیاگرام حرکت کلک‌های لیپیدی همراه با نزدیک‌شدن آنها به یکدیگر و پیوستن دو پروتئین را نشان می‌دهد.

ریزدومن‌هایی از کمپلکس‌های لیپید - پروتئین در غشاءها وجود دارند

یک انتشار ناهمگن و نه همگن لیپیدها و پروتئین‌ها در غشاءها وجود دارد. **ریزدومن‌های**[۱] حاوی لیپیدها و پروتئین‌های اختصاصی وجود دارند. این دومن‌ها که **کلک‌های لیپیدی**[۲] نامیده می‌شوند، ساختمان‌های دولایه سازماندهی‌شده‌ای با توزیع لیپیدی متفاوت از غشاء احاطه‌کننده آنها هستند. لذا غشاءهای بیولوژیک واقعاً یک موزائیک مایع از ریزدومن‌های مختلف می‌باشند (شکل ۳۱-۱۲). در غشاءهای پلاسمایی این ریزدومن‌ها درصد مهمی از ناحیه کلی را شامل می‌شوند. عملکرد کلک‌های لیپیدی، جداسازی و افزایش غلظت پروتئین‌های اختصاصی در جهت تسهیل فعالیت آنها می‌باشد. کلک‌های کوچک‌تر دائماً در حال همایش و فروپاشی هستند و به‌راحتی در داخل غشاء انتشار می‌یابند. غشاءهای پلاسمایی و غشاءهایی که قرار است با غشاءهای پلاسمایی تعامل کنند، برای مثال سمت ترانس کمپلکس گلژی، مقادیر زیاد این ریزمحیط‌ها را دارند، ولی ممکن است در سایر غشاءهای سلولی نیز وجود داشته باشند. کلک‌های غشایی به صورت ریزمحیط‌های کوچک (۱۰-۲۰۰ nm)، ناهمگن، پویای غنی از کلسترول و اسفنگولیپیدها تعریف می‌شوند. گرچه لیپیدهای موجود در کلک‌ها لزوماً در وضعیت فیزیکی / شیمیایی یکسانی قرار ندارند. هر چه غلظت کلسترول بیشتر باشد، سیالیت آنها نسبت به محیط لیپیدی اطراف کمتر می‌شود. کلسترول در همایش کلک‌های لیپیدی در کمپلکس گلژی و در حفظ یکپارچگی و عملکرد آنها مهم می‌باشد. این دومن‌ها ممکن است نقشی در انتقال کلسترول داشته باشند.

لایه‌های خارجی کلک‌ها غلظت بالاتر سرامیدها و فسفواسفنگولیپیدها را دارند (ص ۶۲۳) که خود معمولاً حاوی اسیدهای چرب زنجیر بلندتر می‌باشند. تجمع اینها در لایه خارجی منجر به ایجاد نواحی با افزایش ضخامت غشایی می‌شود. لایه داخلی حاوی فسفولیپیدهایی با زنجیرهای آسیل شدیداً اشباع‌تر از نواحی غیرکلکی هستند که امکان بسته‌بندی زنجیرها در نزدیکی یکدیگر را فراهم می‌سازد. لذا در مقایسه با دولایه اطراف، لیپیدهای موجود در کلک‌ها منظم‌تر و متراکم‌تر هستند. به علاوه، تعاملات الکترواستاتیک گروه‌های سر قطبی، تعاملات آبگریز کلسترول با فسفولیپیدها یا گلیکولیپیدهای انتخاب‌شده، و تعاملات پروتئین -لیپید، حرکت لیپیدها را تحت فشار قرار می‌دهد. از طریق تعامل

---

1. Microdomains 2. Lipid rafts

پروتئین - پروتئین و پروتئین -لیپید کلک‌های کوچکتر، ساب‌دومن‌های بزرگتر منظم در غشاء به‌وجود می‌آیند. برخی از اینها در نواحی اختصاصی از غشاء پلاسمایی وجود دارند.

برخی پروتئین‌های غشایی اساساً با کلک‌ها ارتباط دارند، برخی وارد شده و خارج می‌شوند، و بقیه تنها در قسمت‌های غیرکلکی غشاء وجود دارند.

پروتئین‌های دارای لنگر گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) (ص ۶۳۶) در داخل کلک‌های لیپیدی قرار دارند و پروتئین‌های لنگری پرنیله CAAX (ص ۶۳۸) در کلک‌های موجود در لایه داخلی وجود دارند. در برخی سلول‌ها، کلک و پروتئین پنهان‌شده، متصل به اسکلت سلولی هستند. برخی پروتئین‌ها که در پیام‌رسانی سلولی نقش دارند، در وضعیت غیرفعال و در کلک‌های مجزا قرار دارند؛ فعال‌سازی زمانی رخ می‌دهد که کلک‌های متعددی با یکدیگر تجمع یافته و یک کلک بزرگتر را به‌وجود آورند که پروتئین‌های غیرفعال را در کنار یکدیگر قرار می‌دهند (شکل ۳۱-۱۲). سایر پروتئین‌ها در حالت بدون لیگاند تمایل ضعیفی به کلک‌ها دارند، ولی بعد از اتصال به لیگاند متحمل یک تغییر کونفورماسیونی یا اولیگومریزاسیون می‌شوند که تمایل آنها برای یک کلک اختصاصی را افزایش می‌دهد. برخی پروتئین‌های محیطی غشاء پالمیتیله شده که سبب پیوستن آنها به یک کلک می‌شود؛ این پروتئین‌ها با دپالمیتیلاسیون جدا می‌شوند.

غشاءهای پلاسمایی سلول‌های مربوط به برخی بافت‌ها، حاوی **غارها**[1] هستند که تورفتگی کوچک فلاسک-مانند می‌باشند و ترکیب لیپید آنها مشابه کلک‌های لیپیدی است؛ این غارها محتوای بالای کلسترول و گلیکواسفنگولیپیدها را دارند. غارها حاوی پروتئین‌های اتصالی کلسترول **کاوئولین**-۱[2]، -۲ یا -۳ هستند که ممکن است مسئول تثبیت این ساختمان باشند.

کلک‌های لیپیدی در بسیاری از فرایندهای سلولی، شامل دسته‌بندی و تردد غشایی، و در پولاریزاسیون غشاء نقش دارند. پیام‌رسانی فاکتور رشد و گیرنده پروتئین G نیز با همکاری کلک‌ها انجام می‌شود. نقش کلک‌های لیپیدی در بیماریزایی حالاتی نظیر آلزایمر، پارکینسون، بیماری‌های قلبی-عروقی، لوپوس اریتماتوس سیستمیک، و HIV گزارش شده است. باکتری‌ها، پرایون‌ها (ارتباط بالینی ۶-۳ را ببینید)، ویروس‌ها، و انگل‌ها برای ایجاد عفونت از کلک‌های غشایی سلول‌ها استفاده می‌کنند.

محیط پویای غشاءها

غشاءهای بیولوژیک (شکل ۲۲-۱۲ را ببینید) در یک وضعیت تغییر دائمی، به صورت حرکت جانبی پروتئین‌ها و لیپیدها، اتصال و جدایی پروتئین‌ها در غشاء، با ورود و خروج پروتئین‌ها و لیپیدها، و با تغییر (برای مثال، استیلاسیون و فسفریلاسیون) پروتئین‌ها، قرار دارند. حتی ضخامت دولایه لیپیدی به دلیل تغییر در ترکیب لیپیدها و پروتئین‌ها متفاوت

1. Caveola 2. Caveolin-1

می‌باشد. ریزمحیط‌ها دائماً تشکیل شده و متفرق می‌شوند. با توجه به تعداد آنزیم‌ها، گیرنده‌ها، کانال‌ها و انتقال‌دهنده‌ها، یک غشاء یک محیط بسیار شلوغ است. اجزاء غشاء پلاسمایی پستانداران با اسکلت سلولی سیتوپلاسم، اجزاء خارج‌سلولی و سایر سلول‌ها تعامل می‌کنند. پیچیدگی و وضعیت دینامیک (پویایی) غشاءهای بیولوژیکی یا نقش گسترده آنها در فرایندهای بیولوژیکی مختلف زیاد را نمی‌توان با کلمات و نمایش‌ها نشان داد.

۱۲-۵ • گیرنده‌های غشایی

سلول‌های بیولوژیک تعداد زیادی **گیرنده** پروتئینی اختصاصی دارند که به سایر ملکول‌ها اتصال یافته و یا با محرک‌های اختصاصی تعامل می‌کنند تا یک پاسخ سلولی را آغاز کنند. پروتئین‌های گیرنده یا متصل به غشاء پلاسمایی یا غشاءهای داخل‌سلولی هستند و یا به صورت پروتئین‌های محلول در سیتوپلاسم یا هسته وجود دارند. ملکول‌هایی که به گیرنده اتصال می‌یابند، **لیگاند** نامیده شده و یک پل ارتباطی یا **پیام** هستند. ملکول‌های پیام می‌توانند در یک بخش یک سلول تولید شده تا سبب ایجاد تغییری در فعالیت قسمت دیگر همان سلول شود، و یا ممکن است توسط یک سلول برای ایجاد تغییر در فعالیت سلول دیگر به وجود آید. ملکول‌های پیام بین‌سلولی، یعنی لیگاندهایی که توسط یک سلول برای تغییر فعالیت سلول دیگر تولید می‌شوند، با گیرنده‌های موجود در غشاء پلاسمایی یا گیرنده‌های داخل سلولی تعامل می‌کنند. لیگاندهایی نظیر ملکول‌های باردار، پپتیدها و پروتئین‌ها، به دلیل بار و اندازه خود، نمی‌توانند از عرض غشاء عبور کنند و با گیرنده‌های غشاء پلاسمایی موجود در سطح خارج‌سلولی غشاء تعامل می‌کنند. ملکول‌هایی که می‌توانند از میان غشاء پلاسمایی انتشار یابند، نظیر استروئیدها، به گیرنده‌های محلول داخل سلولی اتصال می‌یابند. پیام‌های داخل سلولی می‌توانند به گیرنده‌های محلول یا انواع موجود در سمت سیتوپلاسمی غشاء اتصال یابند. انواع متفاوتی از پاسخ‌های اولیه به تعامل گیرنده لیگاند وجود دارد که شامل فعال‌سازی یک آنزیم، آزادسازی یک ملکول ترکیب واسط که توسط ترکیب واسط دیگری در یک مسیر پیام مورد شناسایی قرار می‌گیرد، یا بازنمودن کانال موجود در غشاء در جهت برقراری جریان یون‌ها می‌باشند. مسیرهای هدایت پیام اصلی در فصل ۱۳ (ص ۶۷۹) آورده شده‌اند، و پاسخ‌های بافتی به ملکول‌های پیام در هنگام اشاره به فرایندهای سلولی مختلف شرح داده خواهند شد.

پیام‌رسانی بین سلول‌ها به سلول‌های مجزا امکان پاسخ‌دهی به نیازهای کل موجود زنده را فراهم می‌سازد؛ در جدول ۴-۱۲ نمونه‌هایی از پاسخ به اتصال گیرنده به لیگاند فهرست شده‌اند. صدها گیرنده پلاسمایی مختلف وجود دارد؛ جدول ۵-۱۲ سه کلاس اصلی را فهرست کرده است. بزرگترین و متنوع‌ترین گروه گیرنده‌های غشایی، گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G (ص ۷۰۸) می‌باشند که در هر دو سلول پروکاریوتی و اوکاریوتی وجود دارند.

گیرنده‌های غشایی براساس هُمولوژی ساختمان پروتئین و مکانیسم طبقه‌بندی می‌شوند؛

جدول ۴-۱۲ • پاسخ‌های سلولی به تعامل لیگاند-گیرنده

تحریک رشد و تمایز
تعدیل سیستم عصبی مرکزی و محیطی
کنترل سیستم تولیدمثل
تنظیم فرایندهای متابولیکی
تحریک فعالیت‌های ایمونولوژیکی

جدول ۵-۱۲ • طبقه‌بندی گیرنده‌های موجود در غشاء پلاسمایی

طبقه‌بندی گیرنده	مثال‌هایی از گیرنده
جفت‌شونده با پروتئین G	گلوکاگون استیل‌کولین
کاتالیتیک: تیروزین کینازی	انسولین اریتروپویتین
انتقال یون	اسید ۷-آمینوبوتیریک گلوتامات

جدول ۶-۱۲ • نمونه‌هایی از گیرنده‌های غشاء پلاسمایی

لیگاند نمونه یا فعالیت	تعداد گیرنده‌ها	گیرنده
Leptin	۴۳	Cytokine type 1 receptors
Interferon	۱۱	Cytokine type 2 receptors
Neurotrophic factor	۴	GPI- anchored
Retinyl guanylate cyclase	۷	Guanylyl cyclase receptors
Interleukin	۸	Interleukin-17 receptors
Laminin	۲۸	Integrins
Low-density lipoprotein	۱۴	Low-density lipoprotein (LDL) receptor
Transferrin	۱۵۶	Other non-7 TM* receptors
Protein tyrosine phosphatase	۲۴	Receptor tyrosine kinases
Insulin receptor precursor	۸۷	Receptor tyrosine kinases
Dopamine; oxytocin; light	۷۵۴	Seven transmembrane (7TM) receptors
Serine/threonine kinase R2	۱۳	TGF- beta serine/threonine kinase receptors
Cell adhesion	۳۶	Tetraspanins
Tumor necrosis factor precursor	۳۳	TNF/NGF

*TM، عرض غشایی.

جدول ۷-۱۲ • لیگاندهای گیرنده

یون‌ها	پروتئین‌ها
اسیدهای آمینه	مواد محرک چشایی
لیپیدها	سموم
نوکلئوتیدها	ویروس‌ها
پلی‌پپتیدها	مواد محرک بویایی
هورمون‌ها	فرمون‌ها
نوروترانسمیترها	فوتون‌ها

گیرنده‌های نمونه همراه با لیگاندها/فعالیت خود در جدول ۶-۱۲ فهرست شده‌اند. گیرنده‌ها شدت بالای ویژگی برای لیگاندها را دارند و برخی گیرنده‌ها به محرک‌هایی نظیر نور و درجه حرارت پاسخ می‌دهند (جدول ۷-۱۲). همچنین گیرنده‌هایی در غشاء پلاسمایی، نظیر گیرنده‌های Toll– مانند[1] (TLR) وجود دارند که در هنگام اتصال یک باکتری یا ویروس پاسخی را القاء می‌کنند؛ اتصال سبب تحریک دفاع میزبان در برابر عوامل بیماریزای مهاجم می‌شود. انتقال پروتئین‌هایی که برای ترشح بین شبکه آندوپلاسمی و گلژی هدفمند شده‌اند، مستلزم گیرنده‌های غشایی است که پیام‌های اختصاصی دسته‌بندی مشخص‌شده توسط بار[2] در پروتئین‌ها را شناسایی می‌کنند.

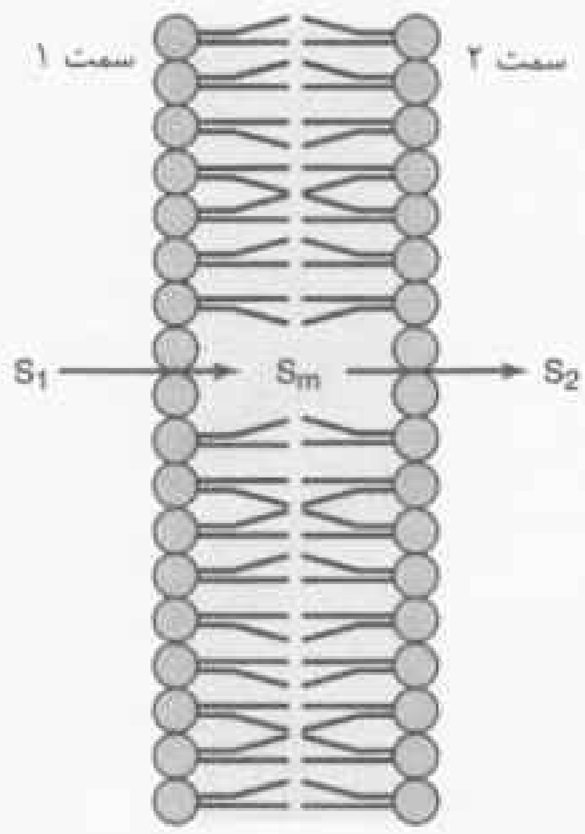
اتصال **ملکول پیام** به گیرنده خود یک فرایند تعادلی است (ص. ۶۹۲). این مشابه اتصال سوبسترا به یک آنزیم است، ولی در اکثر موارد اتصال به گیرنده، هیچ تغییر شیمیایی در لیگاند اتصال‌یافته وجود ندارد. با افزایش یا کاهش غلظت لیگاند آزاد در فاز آبی، لیگاند به گیرنده اتصال یافته و یا از آن جدا می‌شود. اکثر گیرنده‌ها تمایلات بسیار بالایی برای لیگاندهای خود دارند و برخی گیرنده‌ها با لیگاندهای دارای ساختمان غیرمشابه واکنش می‌کنند. گیرنده‌ها اهداف فوق‌العاده‌ای برای عمل عوامل دارویی هستند.

برآورد شده است که حدود ۲۵٪ پروتئین‌هایی که در ژنوم انسانی کد می‌شوند، گیرنده‌های

1. Toll-like receptors 2. Specific Cargo-encoded sorting signals

غشاء پلاسمایی هستند. شدت بالای ویژگی بافتی عمل ملکول‌های پیام به این دلیل است که سلول‌های موجود در بافت‌های مختلف، گیرنده‌های متفاوتی را بیان می‌کنند. به عنوان مثال، انسولین ملکولی است که متابولیسم گلوکز را در عضله و کبد، ولی نه در اکثر بافت‌های دیگر، تغییر می‌دهد. افزایش تعداد گیرنده‌ها، تحت عنوان **تنظیم افزایشی**[1] گیرنده، همراه با پاسخ سلولی بیشتر است؛ کاهش تعداد، تحت عنوان **تنظیم کاهشی**[2] گیرنده، منجر به کاهش پاسخ می‌شود. قرارگیری در داخل غشاء و برداشت از غشاء گیرنده‌ها، یک فرایند کنترل‌شده است.

گیرنده‌های غشایی که بر روی غشاء پل می‌زنند، می‌توانند یک یا چند دومن عرض غشایی اسید آمینه‌ای باشند. گیرنده‌های جفت‌شونده با پروتئین G که در باکتری‌ها و سلول‌های اوکاریوتی وجود دارند (ص ۷۰۸)، حاوی هفت دومن عرض‌غشایی مجزا هستند (گیرنده‌های 7TM). براساس شباهت‌های توالی در دومن‌های عرض‌غشایی، گیرنده‌های 7TM انسانی به شش خانواده تقسیم می‌شوند. برخی گیرنده‌ها برای فعالیت نیاز به تولید اولیگومرهای هُمومریک یا هترومریک دارند. اتصال یک لیگاند سبب تغییر در ساختمان سوم یا چهارم می‌شود که نتیجه آن شروع پاسخ سلولی است. در یک کلاس گیرنده‌ها، یک گیرنده سطحی به یک لیگاند اتصال یافته و سپس به گیرنده دوم (گیرنده پیام) اتصال می‌یابد که واکنش سلولی را آغاز می‌کند. در این حالت، گیرنده اتصالی لیگاند را یک **کمک‌گیرنده**[3] گویند.



شکل ۳۲-۱۲ انتشار یک ملکول محلول از میان یک غشاء. S_1 و S_2 مواد موجود در دو سمت غشاء و S_m ماده موجود در غشاء است.

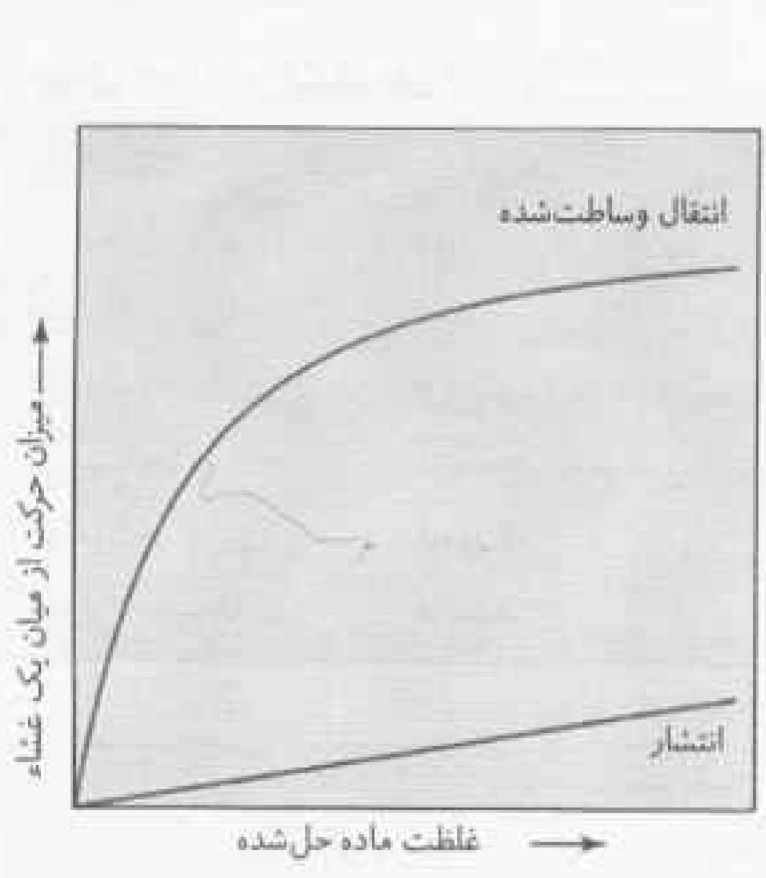
۶-۱۲ • جابه‌جایی ملکول‌ها از میان غشاءها

برخی ملکول‌ها در میان غشاءهای سلولی انتشار می‌یابند

انتشار[4] یک گونه شیمیایی از طریق یک غشاء مستلزم (۱) ترک محیط آبی در یک سمت غشاء، (۲) عبور از محیط لیپیدی غشاء، و (۳) ترک غشاء و ورود به فاز آبی در سمت مخالف می‌باشد (شکل ۳۲-۱۲). غلظت تعادلی دو سمت غشاء و سرعت رسیدن به این تعادل تحت کنترل فشارهای ترمودینامیکی و کینتیکی قرار دارد. سرعت انتشار یک گونه شیمیایی در یک غشاء مستقیماً متناسب با حلالیت و ضریب انتشار آن در لیپیدها است؛ مورد اخیر تابعی از اندازه و شکل سوبسترا می‌باشد. حرکت مواد به‌طریق انتشار از غلظت بیشتر به غلظت کمتر صورت می‌گیرد و سرعت آن توسط قانون اول فیک انتشار[5] (معادله ۱-۱۲) بیان می‌شود.

$$J = -D\left(\frac{\delta c}{\delta x}\right) \qquad (۱۲-۱)$$

که در آن J = میزان خالص مواد عبوری در هر زمان، D = ضریب انتشار، و $\frac{\delta c}{\delta x}$ = شیب شیمیایی ماده است. همان‌طورکه در شکل ۳۳-۱۲ شرح داده شده است، با افزایش



شکل ۳۳-۱۲ کینتیک حرکت یک ملکول ماده حل شده از میان یک غشاء. میزان ابتدایی انتشار مستقیماً متناسب با غلظت ماده حل‌شده است. در انتقال وساطت‌شده، با اشباع حامل، سرعت به یک V_{max} می‌رسد.

1. Upregulation 2. Downregulation 3. Coreceptor 4. Diffusion 5. Fick's first law of diffusion

غلظت ماده حل‌شده در یک سمت غشاء، افزایش سرعت ابتدایی انتشار رخ می‌دهد. حرکت خالص ملکول‌ها از یک سمت به سمت دیگر تا زمانی ادامه خواهد یافت که غلظت در هر دو سمت به یک تعادل شیمیایی برسد. تعویض مداوم ملکول‌های حل‌شده از یک سمت به سمت دیگر بعد از برقراری تعادل حاصل می‌شود، ولی دیگر تجمع خالص در هیچ سمتی وجود ندارد، زیرا این تغییر دوباره سبب ایجاد یک شیب غلظتی می‌شود.

گازهایی نظیر O_2، N_2، CO_2، NO، CO و H_2S ملکول‌های آبگریز هستند و در میان نواحی آبگریز یک غشاء انتشار می‌یابند. آب تحت فشار اسموتیک انتشار می‌یابد، ولی در اکثر سلول‌ها این سرعت نیاز به تعادل سریع فازهای آبی دو طرف غشاء پلاسمایی را برطرف نمی‌کند؛ خانواده‌ای از پروتئین‌ها، تحت عنوان آکواپورین، حرکت آب در عرض غشاء را تسهیل می‌کند (ص ۶۴۹). قشر آب احاطه‌کننده بسیاری از مواد حل‌شده می‌بایست قبل از ورود ماده حل‌شده به محیط لیپیدی، جدا گردد. به دلیل تعامل با آب و دفع گونه‌های باردار توسط محیط آبگریز غشاءها، یون‌های معدنی و ملکول‌های آلی باردار، با سرعت قابل‌توجهی انتشار نمی‌یابند. به دلیل اندازه و بار، ملکول‌های آلی بدون بار، نظیر قندها و همچنین پپتیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ضرورتاً دفع می‌شوند. در صورتی‌که انتشار رخ دهد، سرعت آن برای رفع نیازهای سلولی بسیار پایین می‌باشد.

مکانیسم‌های پروتئین-محور برای جابه‌جایی

چند صد سیستم وابسته به پروتئین، هر کدام با مجموعه متفاوتی از پروتئین‌ها، به وجود آمده‌اند تا سبب تسهیل در حرکت آب، یون‌ها، مواد غذایی، محصولات بیهوده متابولیکی و ماکروملکول‌ها از عرض غشاءهای مختلف شوند. پروتئین‌های درگیر در هر سیستم از موجودات مختلف و حتی بین اعضاء موجود در یک گونه، بسیار شبیه ولی نه یکسان هستند. یک سیستم طبقه‌بندی عملکردی برای پروتئین‌های انتقالی غشاء توسط **اتحادیه بین‌المللی بیوشیمی و بیولوژی ملکولی**[1] **(IUBMB)** پیشنهاد شده است (جدول ۸-۱۲) که آنها را براساس مکانیسم انتقال و خصوصیات آنها، به کلاس‌ها، زیرکلاس‌ها، خانواده‌ها و زیرخانواده‌ها تقسیم می‌کنند. بسیاری از پروتئین‌ها تنها در پروکاریوت‌ها وجود دارند؛ بسیاری از انواع دیگر هم در پروکاریوت‌ها و هم در اوکاریوت‌ها، از جمله انسان، وجود دارند. یک هُمولوژی ساختمانی پروتئین‌ها در بسیاری از زیرخانواده‌ها وجود دارد. در ادامه بر روی سیستم‌های انتقالی موجود در سلول‌های پستانداران و به‌طور اختصاصی بر روی کلاس‌هایی متمرکز می‌شویم که به عنوان **منفذ/کانال**[2] (1.A، 1.B و 1.C) و **انتقال‌دهنده**[3] (2.A و 2.B) مشخص می‌گردند (جدول ۸-۱۲). انواع مختلف اشکال دیگر برای شرح سیستم‌های انتقالی در مقالات علمی وجود دارند، ولی در اینجا از فهرستی استفاده می‌شود که در حال حاضر توصیه می‌گردد.

1. International Union of Biochemistry and Molecular Biology   2. Pore/channel   3. Transporter

جدول ۸-۱۲ • طبقه‌بندی پروتئین‌های انتقالی غشاء

کلاس	زیرکلاس (تعداد خانواده‌ها)
۱. منافذ و کانال‌ها	
	A.۱. کانال‌های مارپیچی α (۳۶)
	B.۱. پورین‌های رشته β (۳۴)
	C.۱. سموم تولیدکننده منفذ (۵۸)
	D.۱. کانال‌هایی که بر روی ریبوزوم سنتز نمی‌شوند (۱۰)
۲. انتقال‌دهنده‌هایی که به کمک پتانسیل الکتروشیمیایی کار می‌کنند	
	A.۲. انتقال‌دهنده‌ها یا حامل‌ها (تک‌انتقال‌دهنده، هم‌انتقال‌دهنده همسو، هم‌انتقال‌دهنده ناهمسو (۸۰)
	B.۲. انتقال‌دهنده‌هایی که بر روی ریبوزوم‌ها سنتز نمی‌شوند (۶)
۳. انتقال‌دهنده‌های فعال اولیه	
	A.۳. انتقال‌دهنده‌هایی که به کمک هیدرولیز پیوند P-P کار می‌کنند (۱۴)
	B.۳. انتقال‌دهندهایی که با دکربوکسیلاسیون کار می‌کنند (۱)
	C.۳. انتقال‌دهنده‌هایی که با انتقال متیل کار می‌کنند (۱)
	D.۳. انتقال‌دهنده‌هایی که با اکسیداسیون-احیاء کار می‌کنند (۹)
	E.۳. انتقال‌دهنده‌هایی که به کمک نور کار می‌کنند (۲)
۴. جابه‌جاکننده‌های گروه	
	A.۴. فسفوترانسفرازها (۶)
۵. حاملین الکترون در عرض غشاء	
	A.۵. حاملین دو- الکترونی (۲)
	B.۵. حاملین تک-الکترونی (۳)

منافذ و کانال‌ها مستلزم وجود یک منفذ آبی در ساختمان پروتئینی است که از طریق آن ملکول‌ها انتشار می‌یابند؛ حرکت با یک مکانیسم دریچه‌ای کنترل می‌شود. پروتئین‌های انتقالی مشابه آنزیم‌ها هستند، در یک سمت غشاء به ماده‌حل‌شده اتصال یافته و سپس با تغییر کونفورماسیون، سوبسترا را به محیط آن طرف غشاء جابه‌جا می‌کنند. این تغییر در داخل قسمت غشایی پروتئین انتقالی صورت می‌گیرد. اکثر منافذ/کانال‌ها و انتقال‌دهنده‌ها شدت بالای ویژگی را برای ماده حل‌شده دارند. سرعت جابه‌جایی سوبسترا توسط کانال‌ها بیشتر از این سرعت در انتقال‌دهنده‌های اختصاصی است؛ در مورد کانال‌ها سرعت حدود 10^7 یون در هر ثانیه می‌باشد که سرعت انتشار یک سوبسترا در آب است، در حالی‌که این سرعت در مورد انتقال‌دهنده‌ها 10^3-10^2 ملکول در ثانیه می‌باشد.

انواع مختلفی از مواد، تحت عنوان **سوبسترا**، نظیر آنیون‌ها و کاتیون‌های معدنی، آب، ترکیبات واسط متابولیک، ملکول‌های آلی، داروها و ماکروملکول‌ها، انتقال داده می‌شوند.

در سلول‌های اوکاریوتی، مواد انتقالی در طی این فرایند بدون تغییر می‌باشند. برخی باکتری‌ها کلاسی از انتقال‌دهنده‌ها را تحت عنوان جابه‌جایی گروه دارند که در آن سوبسترا در هنگام انتقال متحمل تغییر شیمیایی می‌شوند (یک نگاه دقیق‌تر ۲-۱۲). برخی سوبستراها در سلول‌های مختلف یا در یک سلول، با دو مکانیسم متفاوت انتقال داده می‌شوند. زیر خانواده‌های مربوط به پروتئین‌های انتقالی ایزوفرم‌های زیادی دارند که فعالیت همگی آنها یکسان است. به‌عنوان مثال، نفرون کلیه حداقل هفت ایزوفرم متفاوت آکواپورین را دارد که تمامی آنها مسئول جابه‌جایی آب هستند. به‌علاوه، بسیاری از انتقال‌دهنده‌ها توسط ملکول‌های پیام داخل- یا خارج‌سلولی کنترل می‌شوند و به‌عنوان گیرنده‌های مربوط به لیگاند اختصاصی نیز مورد اشاره قرار می‌گیرند (قسمت ۵-۱۲).

> **یک نگاه دقیق‌تر ۲-۱۲**
>
> **جابه‌جایی گروه و چرخه γ-گلوتامیل**
>
> برخی باکتری‌ها مکانیسمی برای برداشت قندها، تحت عنوان **جابه‌جایی گروه** دارند که طی آن قند از نظر شیمیایی تغییر می‌کند. قند بعد از اتصال ولی قبل از آزادسازی، فسفریله می‌شود. قند فسفریله، و نه قند غیرفسفریله ابتدایی، به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شود. هیچ سیستم انتقال گروهی در سلول‌های پستانداران یافت نشده است. چرخه γ-گلوتامیل (ص. ۱۰۵۹) که سیستم مهمی برای برداشت اسیدهای آمینه توسط برخی سلول‌های پستانداران است، مستلزم تغییر اسید آمینه توسط γ-گلوتامیل ترانسفراز در سطح خارجی غشاء سلولی می‌باشد. سپس اسید آمینه تغییریافته توسط یک انتقال‌دهنده مربوط به اسید آمینه به‌داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شود. این چرخه به‌عنوان جابه‌جایی گروه طبقه‌بندی نمی‌شود، زیرا تغییر شیمیایی و انتقال توسط پروتئین‌های متفاوتی کاتالیز می‌شوند.

۷-۱۲ • کانال‌ها و منافذ غشایی

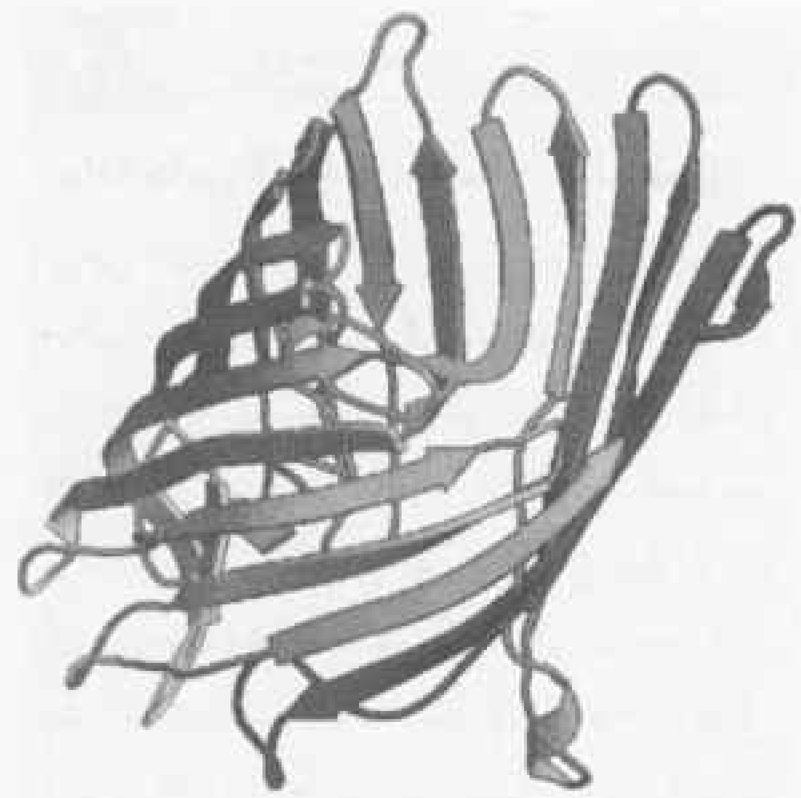
کانال‌ها و **منافذ** غشایی در موجودات زنده فراگیر هستند، در تمامی انواع موجودات، از باکتری‌ها تا اوکاریوت‌های عالی، وجود دارند. کانال‌ها و منافذ امکان انتشار در میان کانال‌های آبی حاصل از پروتئین‌های انتقالی فراهم می‌سازند. اینها ملکول‌ها یا یون‌ها انتقالی را پنهان نمی‌کنند و ویژگی آنها بستگی به اندازه و بار ماده دارد. انتشار در کانال‌ها و منافذ (۱) در جهت شیب غلظتی ماده عبوری از غشاء صورت می‌پذیرد، (۲) فعال بدون مصرف انرژی متابولیکی برای حرکت واقعی ماده است، (۳) تحت تنظیم توسط مکانیسم‌های اختصاصی قرار دارد که مسیر عبوری را باز می‌کنند یا می‌بندند، و (۴) توسط ترکیبات مختلفی مهار می‌شود. منافذ شامل تعدادی پروتئین مختلف هستند و، در مقایسه با کانال‌ها، یک ساختمان بسیار پیچیده دارند. یک تفاوت اصلی بین کانال‌ها و منافذ، ویژگی در چیزی است که سیستم اجازه جابه‌جایی آن را می‌دهد. منافذ سوراخ‌های نسبتاً بزرگی هستند که امکان عبور ملکول‌های کوچک و بزرگ در عرض غشاء را فراهم می‌کنند، در حالی که کانال‌ها شدت بالای ویژگی ماده را دارند.

ساختمان کانال‌های غشایی

پروتئین‌های کانال یکی از دو ساختمان اصلی را دارند: کانال‌های نوع α و کانال‌های لوله β. **کانال‌های نوع α** پروتئین‌های هُمو- یا هترومری، در برخی موارد با چند زیرواحد غیرمشابه، هستند و می‌توانند ۲ تا ۲۲ **قطعه مارپیچی α** عرض غشایی داشته باشند (شکل ۲۷-۱۲ را ببینید). یکی از خصوصیات فیزیکی معمول کانال‌ها، ساختمان تولیدی توسط مارپیچ‌های α دوگانه‌دوست از قطعات عرض غشایی متفاوت موجود در یک زنجیر پلی‌پپتیدی یا زیرواحدهای پروتئینی مختلف در جهت تولید یک کانال آبی مرکزی می‌باشد. علاوه بر دومن‌های حاوی منفذ واقعی، پروتئین‌های کانالی دومن‌هایی برای اتصال لیگاند یا برای حس تغییرات فیزیکی، نظیر تغییراتی در پتانسیل غشایی، دارند که باز و بسته‌شدن کانال را کنترل می‌کند. کانال‌های

نوع α در پستانداران به‌عنوان حسگرهای سلولی عمل می‌کنند که به تغییرات درجه حرارت، لمس، درد، اسمولاریتی، فرومون‌ها[1]، چشایی و سایر محرک‌ها پاسخ می‌دهند.

کانال‌های لوله β یک توالی عرض‌غشایی متشکل از **رشته‌های β** دارند که یک ساختمان لوله- β (ص ۱۲۶) با یک کانال پر از آب با قطر ۰٫۶ تا ۳ nm به‌وجود می‌آورند (شکل ۳۴-۱۲). این کانال‌ها در غشاءهای خارجی میتوکندری‌ها (پورین‌ها)، برخی باکتری‌ها، و پلاستیدها وجود دارند. چندین پورین باکتریایی متشکل از ساختمان لوله β۱۶ رشته‌ای موازی ناهمسو با ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین نزدیکترین همسایگان در طول زنجیر می‌باشند. قوس‌های پلی‌پپتیدی در داخل دیواره لوله ردیف شده و پهنای کانال را محدود نموده و سبب محدودیت اندازه ملکول‌هایی می‌شود که از میان آن انتشار می‌یابند. این زیرکلاس کانال‌ها دامنه وسیعی از ویژگی‌ها، از یون‌های معدنی تا پروتئین‌ها، را دارند. پورین‌ها می‌توانند غیرانتخابی بوده یا درجاتی از انتخابی‌بودن را نشان دهند، و برخی امکان عبور هر نوع ملکول کوچکتر از یک اندازه مشخص را فراهم می‌سازند.



شکل ۳۴-۱۲ ساختمان پورین Ompf در یک شکل کریستالی چهارگوش. قطعات عرض‌غشایی پورین شامل مارپیچ‌های β هستند.

کنترل و انتخابی‌بودن کانال‌های غشایی

دو کلاس از کانال‌ها که بیشترین مطالعات بر روی آنها انجام شده است، شامل **کانال‌های دریچه‌دار- ولتاژی**[2] که به پتانسیل عرض‌غشایی پاسخ می‌دهند، و **کانال‌های دریچه‌دار- لیگاندی**[3] که به اتصال لیگاند پاسخ می‌دهند، می‌باشند. کانال‌های دریچه‌دار- ولتاژی یک دومن حسگر اختصاصی در پروتئینی را دارند که تغییرات پتانسیل غشایی را مورد جستجو قرار می‌دهند و انرژی را به دومن کانالی انتقال می‌دهند که دریچه آن را کنترل می‌کند. به‌عنوان مثال، دپولاریزاسیون غشاء پلاسمایی منجر به بازشدن کانال‌های Na^+ می‌گردد. غشاء خارجی میتوکندری حاوی یک کانال آنیونی وابسته به ولتاژ متشکل از صفحات β می‌باشد که اجازه عبور مواد تا ۱۰ kDa را می‌دهد و در آپوپتوز (ص ۱۳۴۰) نقش دارد. کانال‌های تحت تنظیم لیگاند به اتصال لیگاندهای خارج‌سلولی یا داخل‌سلولی شیمیایی (که **آگونیست** نیز نامیده می‌شوند) پاسخ می‌دهند و، برحسب کانال، منجر به باز یا بسته‌شدن کانال می‌گردند. برخی حاوی چندین دومن اتصال به لیگاند هستند که امکان اتصال تعاونی را فراهم می‌سازد. باز و بسته‌شدن به طرق مختلفی انجام می‌شوند که عبارتند از (۱) با قطعات عرض‌غشایی مارپیچی α که منفذ را می‌پوشانند و همانند یک جسم سخت به‌واسطه کج‌شدن، چرخش یا خم‌شدن حرکت می‌کنند و (۲) یک انتهای اتصال‌یافته که به داخل کانال رفته و همانند یک توپی آن را می‌بندد.

اتصال استیل‌کولین **به گیرنده نیکوتینی استیل‌کولین** سبب بازشدن کانال شده و امکان ورود Na^+ به داخل سلول را فراهم می‌سازد. این تغییر در انتقال پیام الکتریکی عصبی مهم است (ص ۱۲۴۹). کانال‌های دیگر تحت کنترل اتصال نوروترانسمیترها (ص ۶۹۶)،

1. Feromones 2. Voltage-gated channels 3. Ligand-gated channels

cAMP (ص ۷۱۹)، اینوزیتول ۱،۴،۵-تریس‌فسفات، دی‌آسیل‌گلیسرول (ص ۷۲۳)، و پروتئین‌های G (ص ۷۰۸) قرار دارند. بازشدن بیشتر کانال‌ها بسیار سریع است که امکان جریان انفجاری یون‌ها با سرعت 10^7 یون در هر ثانیه از عرض غشاء را فراهم می‌سازد. این سرعت لازم است، زیرا بسیاری از این کانال‌ها در هدایت عصبی و انقباض عضلانی نقش دارند. سطح یک انتهای عصبی می‌تواند حاوی چند صد کانال مختلف، شامل کانال‌های وابسته به ولتاژ برای Ca^{2+} و K^+، کانال‌های پتاسیمی دریچه‌دار وابسته به Ca^{2+}، کانال‌های کلری، کانال‌های دریچه‌دار-لیگاندی و کانال‌های فعال‌شونده-کششی[1]، باشد. برخی کانال‌ها نه تنها با اتصال لیگاند، بلکه همچنین با فسفریلاسیون- دفسفریلاسیون کنترل می‌شوند. تعدادی از عوامل فارماکولوژیکی به صورت درمانی در تعدیل فعالیت کانال‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ آنهایی که سبب مهار می‌شوند را **آنتاگونیست** گویند.

کلاس‌های مختلف کانال‌ها نسبت به یون معدنی، ملکول آلی کوچک (برای مثال، اوره)، یا پروتئین بسیار انتخابی هستند که امکان عبور از میان کانال را فراهم می‌سازند. **کانال سدیمی** غشاءهای پلاسمایی مربوط به سلول‌های اوکاریوتی امکان حرکت Na^+ با سرعت بیش از ۱۰ برابر نسبت به K^+ را فراهم می‌سازد و برخی کانال‌های K^+ نسبت به K^+ ۱۰۰ تا ۱,۰۰۰ برابر نفوذپذیرتر می‌باشند. کانال‌های دیگر کمتر اختصاصی هستند. برخی اعضاء خانواده آکواپورین تنها برای آب انتخابی هستند، در حالی که بقیه امکان جابه‌جایی هم آب و هم ملکول‌های آلی خنثی کوچک را فراهم می‌سازند (ص ۶۵۰). همچنین تفاوت‌هایی بین بافت‌ها از نظر کانال‌هایی وجود دارد که یک ماده را انتقال می‌دهند. یکی از روش‌های انتخابی‌بودن مستلزم ایجاد حلقه‌هایی با ریشه‌های دارای بار مثبت در کانال می‌باشد که کاتیون‌ها را دفع کرده و جریان آنیون‌ها را تسهیل می‌کند؛ ریشه‌های دارای بار منفی نیز جریان کاتیون‌ها را تسهیل می‌کنند.

کانال‌ها و منافذ غشایی نمونه

آکواپورین و آکواگلیسروپورین‌ها

برای تمامی سلول‌ها کنترل توزیع آب در عرض غشاء پلاسمایی و غشاءهای داخلی ضروری است، زیرا تغییرات فشار اسموتیک می‌تواند سبب افزایش یا کاهش وسعت بخش‌های احاطه‌شده توسط این غشاءها گردد. انتشار تسهیل‌نشده آب در عرض غشاءهای بیولوژیکی رخ می‌دهد، ولی این انتشار آنقدر آهسته است که نمی‌توان آن را به حساب سرعت مورد نیاز حرکت آب در نظر گرفت. بیش از ۲۰۰ پروتئین کانالی مختلف در گیاهان، باکتری‌ها، حشرات و مهره‌داران امکان جا‌به‌جایی آب و سایر ملکول‌های کوچک را فراهم می‌سازند و گروهی از اینها را **آکواپورین**[2] **(AQP)** می‌نامند. دوازده آکواپورین در پستانداران مورد شناسایی قرار گرفته است که براساس هُمولوژی توالی اسید آمینه‌ای و خصوصیات عملکردی

1. Stretch-activated 2. Aquaporins

جدول ۹-۱۲ • محل‌های بیان آکواپورین‌های انتخابی در انسان

بافت	محل بیان	اکواپورین	عملکرد
سلول‌های خونی	گلبول‌های قرمز	AQP1	حفاظت اسموتیک
	گلبول‌های سفید	AQP9[a]	؟
مغز	شبکه مشیمیه	AQP1	حفاظت مایع مغزی نخاعی
	سلول‌های اپاندیمی	AQP4	تعادل مایع مغزی نخاعی
	هیپوتالاموس	AQP4	حس اسمولاریتی (؟)
چشم	سلول‌های فیبر عدسی	AQP0	تعادل مایع در عدسی
	اپی‌تلیوم مژگانی	AQP1	تولید مایع زلالیه
کلیه	توبول‌های پروگزیمال	AQP1	تغلیظ ادرار
	مجاری جمع‌کننده	AQP2	وساطت فعالیت ADH[b]
	مجاری جمع‌کننده	AQP3[a]	بازجذب آب به‌داخل بدن
	مجاری جمع‌کننده	AQP4	بازجذب آب
	مجاری جمع‌کننده	AQP4	؟
ریه	سلول‌های اپی‌اتیال کیسه هوایی	AQP1	هیدراتاسیون کیسه هوایی
	اپی‌تلیوم برنش	AQP4	ترشح برنشی مایع
دهان و گلو	سلول‌های اپی‌تلیال نای	AQP3[a]	ترشح آب به‌داخل نای
	غدد بزاقی	AQP5	تولید بزاق

[a] یک آکواگلسیروپورین.

[b] هورمون ضدادراری.

به کانال‌هایی که تنها برای آب (آکواپورین) انتخابی هستند و آنهایی که امکان جابه‌جایی آب و مواد کوچک (**آکواگلیسروپورین‌ها**[1])، تقسیم شده‌اند. آکواپورین امکان حرکت H_2O ولی نه یون هیدرونیوم (H_3O^+) را فراهم می‌سازند و به موجب آن شیب غلظتی را در عرض غشاء سلول حفظ می‌کنند. انسان حداقل ۱۰ آکواپورین و آکواگلیسروپورین (AQP0 تا AQP9) دارد؛ جدول ۹-۱۲ محل بیان آکواپورینی انتخابی را در انسان نشان می‌دهد. برخی بافت‌ها چندین ایزوفرم مختلف با فعالیت‌های متفاوت دارند؛ کلیه حداقل هفت ایزوفرم دارد که در محل‌های مجزایی در طول نفرون و مجرای جمع‌آوری کننده قرار دارند. ارتباط بالینی ۳-۱۲ به تشریح انتشار آکواپورین در کلیه و مثال‌هایی از تغییرات پاتوفیزیولوژیکی می‌پردازد. آکواپورینی گیاهی در برداشت آب توسط ریشه، تبخیر[2] و خشک‌سازی دانه[3] همکاری دارند.

آکواپورین پروتئین‌های غشایی کوچک، آبگریز داخلی هستند که توالی‌های اسید آمینه‌ای حفظ‌شده زیادی دارند. این پروتئین‌ها در داخل غشاء به‌صورت هُموتترامر همایش

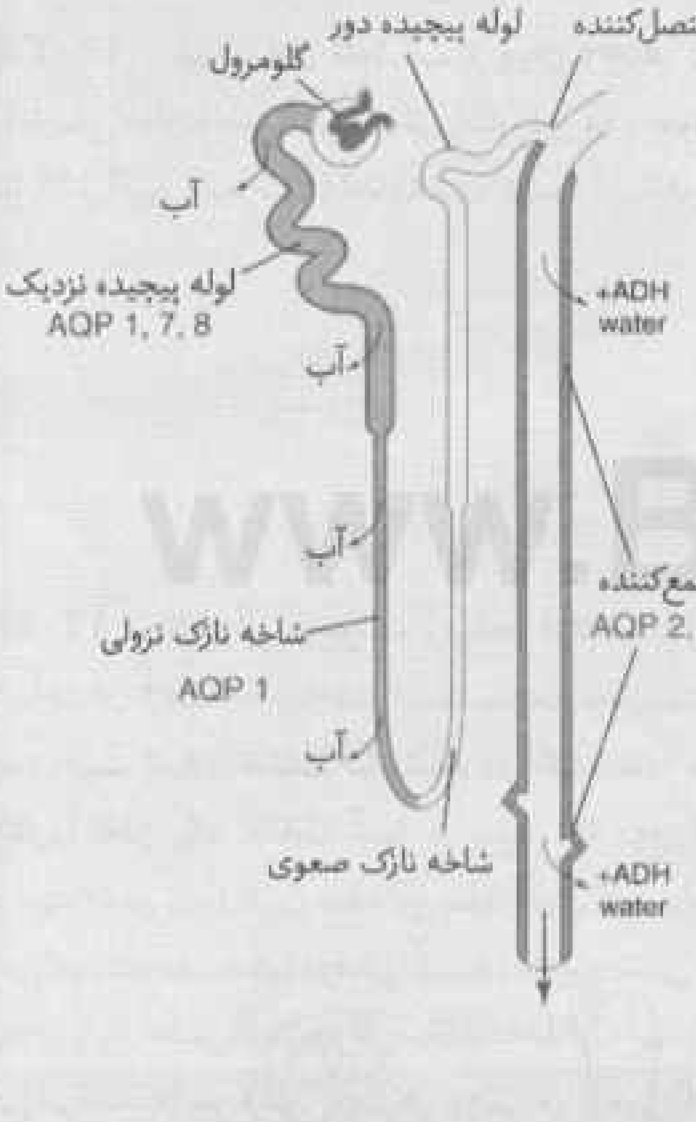
1. Aquaglyceroporins 2. Transpiration 3. Seed desiccation

ارتباط بالینی ۳-۱۲

کلیه پستانداران و آلواپورین‌ها

نقش اصلی کلیه در تنظیم pH خون، حذف محصولات سمی متابولیسم، و تنظیم تعادل آب بدن می‌باشد. هر کدام از کلیه‌ها حدود یک میلیون نفرون دارند که واحدهای عملکرد چندسلولی این بافت است. هر نفرون چندین ناحیه دارد (شکل را ببینید) که هر کدام دارای فعالیت‌های بسیار اختصاصی در پردازش صاف‌شده خون تولیدی در گلومرول هستند. مقدار زیادی از خون صاف‌شده (حدود ۱۵۰ لیتر در روز) و آب می‌بایست در نفرون و مجاری جمع‌کننده بازجذب شود و تنها ۱٫۵ لیتر آن به صورت ادرار دفع می‌شود. آکواپورین‌ها مسئول بازیافت آب از صاف‌شده در هنگام عبور آن از مجرای نفرون می‌باشد. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، حداقل هفت ایزوفرم مختلف آکواپورین‌ها وجود دارند که در محل‌های متفاوتی در طول نفرون و مجاری جمع‌کننده قرار دارند، مسئول بازجذب آب می‌باشند.

تعدادی ناهنجاری کلیوی وجود دارد که در آنها بازجذب آب غیرطبیعی است و بیان و عملکرد آکواپورین‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. چندین مدل حیوانی این حالات در تعیین علت برخی از این حالات با ارزش بوده‌اند. مقادیر کم AQP2 و پلی‌اوری (دفع اضافی ادرار) در دیابت بی‌مزه کلیوی[1] (NDI) اکتسابی، هیپوکالمی (پتاسیم پایین خون) اکتسابی، و هیپرکلسمی (افزایش کلسیم خون) یافت شده است. در بسیاری از موارد، NDI در نتیجه ناتوانی کلیه در پاسخ به وازوپرسین ایجاد می‌شود؛ به نظر می‌رسد که این حالت منجر به کاهش بیان و یا کاهش قرارگیری AQP2 در غشاء می‌شود. در موارد دیگر NDI، نقص در ژن آکواپورین وجود دارد؛ در بعضی موارد، این نقص منجر به ناتوانی منومرها در تولید ساختمان‌های تترامری طبیعی می‌شود. مقادیر AQP1، AQP2 و AQP3 موجود در مدل‌های حیوانی در بافت‌های دچار ایسکمی کاهش می‌یابد. در برخی شرایط، نظیر نارسایی احتقانی قلب، سیروز کبدی، و حاملگی، افزایش میزان AQP2 در کلیه وجود دارد که منجر به افزایش حجم مایع خارج‌سلولی می‌شود. انسان فاقد فعالیت AQP1 کلیه، به شکل واضحی در حالت طبیعی فاقد هر نوع مشکل قابل اندازه‌گیری است، ولی ممکن است در شرایط استرس (دهیدراتاسیون) این مشکلات وجود داشته باشند. انتظار می‌رود تغییر در سایر آکواپورین‌ها با حالات بالینی دیگری ارتباط داشته باشند.

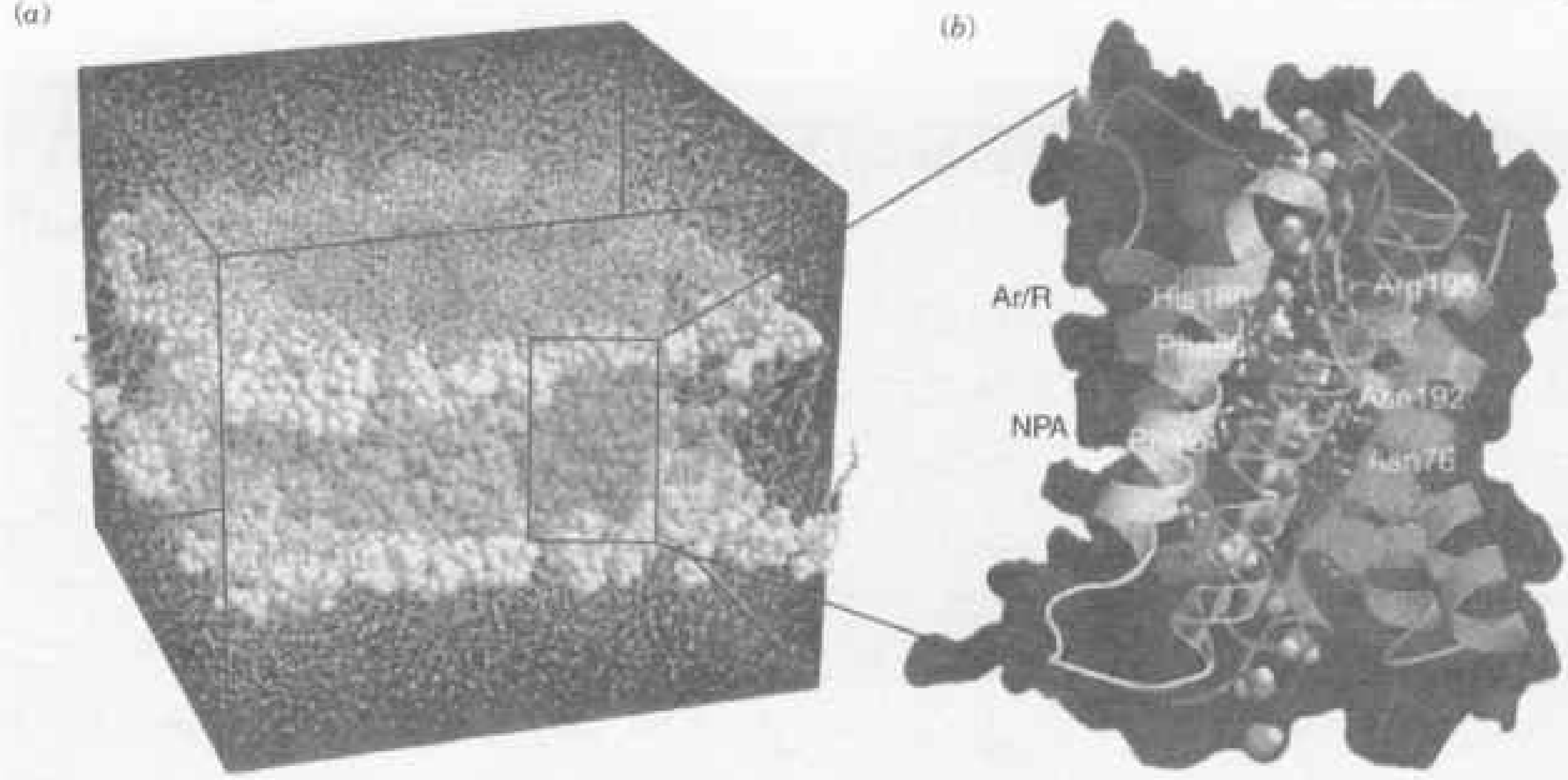


موقعیت آکواپورین‌ها در هر قطعه نفرون و مجرای جمع‌کننده کلیه

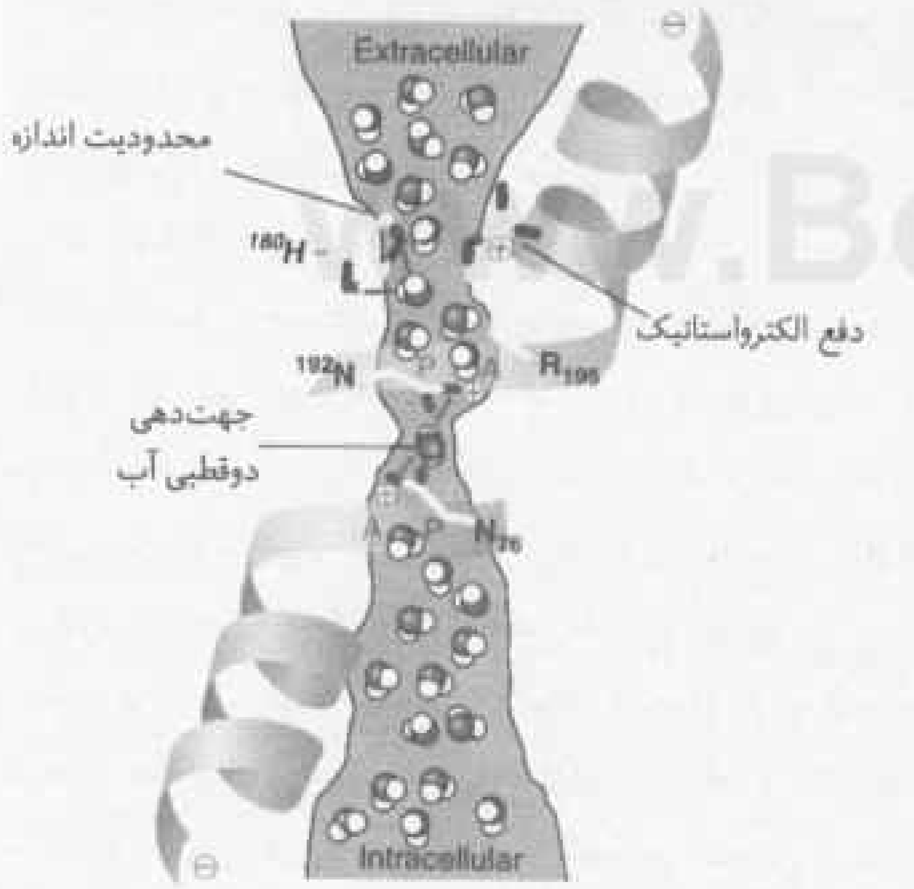
1. Nephrogenic diabetes insipidus

می‌یابند (شکل ۳۵-۱۲). هر منومر، متشکل از شش دومن مارپیچی α عرض‌غشایی، یک منفذ آب مجزا دارد. AQP1 گلبول قرمز انسانی یک موتیف توالی شدیداً حفظ‌شده متشکل از آسپاراژین-پرولین-آلانین در دو قوس مجزا دارد. این قوس‌ها به شکل ساعت شنی[1] به داخل دولایه لیپیدی تا شده و یک کانال آبی را به وجود می‌آورند. خاصیت انتخابی این کانال به‌واسطه باریک‌شدن کانال به حدود ۲٫۸ Å می‌باشد که اندازه ملکول‌های عبوری را محدود می‌کند. مسیر آبی AQP1 (شکل ۳۶-۱۲) توسط ریشه‌های آبگریز

1. Hourglass



شکل ۳۵-۱۲ شبیه‌سازی نفوذ آب از میان AQP1. (a) شبیه‌سازی تترامر AQP1 (نارنجی/مازنتا/آبی/سیان) فرورفته در یک دولایه پالمیتیل اولئیل فسفاتیدیل‌اتانل‌آمین (زرد/سبز) احاطه‌شده توسط آب (قرمز/سفید) متشکل از تقریباً ۱۰۰۰۰۰ اتم. (b) شبیه‌سازی مسیر یکی از منومرهای APQ1 برای نفوذ آب که در میان یک منفذ مشاهده می‌شود.



شکل ۳۶-۱۲ کانال آبی موجود در زیرواحد AQP-1. شکل منفذ آبی (به رنگ آبی) از محاسباتی براساس ساختمان AQP1 ساخته شده است. سه خصوصیت انتخابی‌شدن این کانال برای آب عبارتند از: (a) محدودیت اندازه. هشت آنگستروم در بالای نقطه میانی کانال، این منفذ به قطر ۲٫۸ Å باریک (تقریباً قطر یک ملکول آب) می‌شود. (b) دفع الکترواستاتیک. یک ریشه حفظ‌شده (Arg – ۱۹۵،R) در باریک‌ترین نقطه این منفذ سدی را در برابر کاتیون‌ها، شامل آب پروتونه (H_3O^+) به‌وجود می‌آورد. (c) جهت‌دهی دوقطبی آب. دو ماریپچ نسبی در نقطه میانی کانال بیکدیگر رسیده و دوقطبی‌های با بار مثبتی را فراهم می‌سازند که ملکول آب را در هنگام عبور آن از این نقطه، دوباره جهت‌دهی می‌کنند. از بین رفتن پیوند هیدروژنی در زنجیر تک - دسته ملکول‌های آب مانع ایجاد هدایت پروتونی می‌شود.

حفظ شده و چند ریشه آبدوست پوشیده شده است که H_2O را جذب نموده ولی ملکول‌های بارداری نظیر H_3O^+ را جذب نمی‌کنند. ملکول‌های آب به شکل واضحی در یک ردیف در میان این کانال جریان پیدا می‌کنند.

علاوه بر آب، AQP1 امکان جابه‌جایی CO_2، AQP3 گلیسرول و AQP9 امکان جابه‌جایی گلیسرول، اوره، پلی‌اُل‌ها، پورین‌ها، پیریمیدین‌ها، نوکلئوزیدها و منوکربوکسیلات‌ها را فراهم می‌سازند. AQP1 به شکل برگشت‌پذیر توسط $HgCl_2$ مهار می‌شود. AQP2 موجود در کلیه انسان، تحت کنترل هورمونی قرار دارد و حداقل سه مورد دیگر ممکن است توسط pH کنترل شوند.

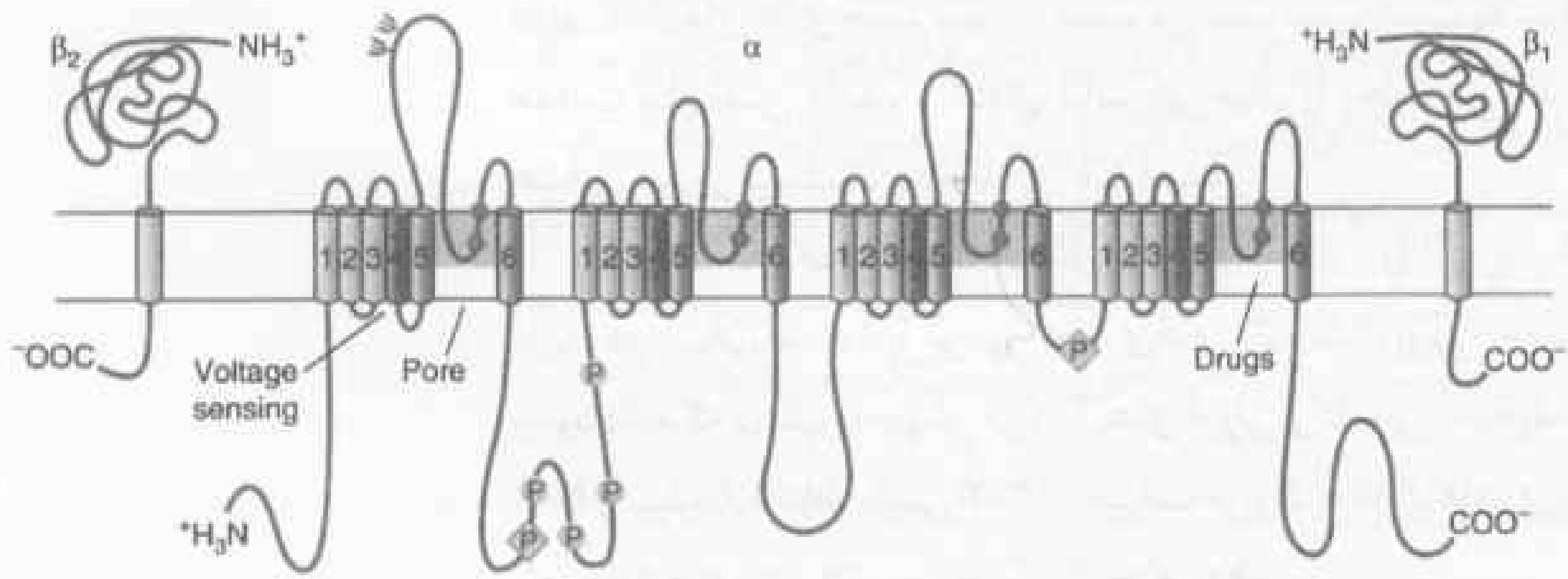
کانال‌های یونی دریچه‌دار- ولتاژی Na^+، Ca^{2+}، K^+ و Cl^-

کانال‌های یونی دریچه‌دار ولتاژی متفاوت مربوط به Na^+، Ca^{2+} و K^+، از طریق پتانسیل الکتریکی موجود در عرض غشاء کنترل می‌شوند. باز و بسته‌شدن این کانال‌ها کاملاً سریع (میلی‌ثانیه) است و در سلول‌های پستانداران مسئول تولید پیام‌های الکتریکی هدایت‌شده در نورون‌ها و سایر سلول‌های تحریک‌پذیر می‌باشد. این کانال‌های یونی اعضاء یک فوق خانواده بزرگ هستند که در باکتری‌ها، آرکی‌ها، ویروس‌ها و اوکاریوت‌ها یافت می‌شوند. در انسان، شش نوع کانال Ca^{2+} و حداقل ۱۰ نوع کانال K^+ وجود دارد که به محرک‌های مختلف پاسخ می‌دهند.

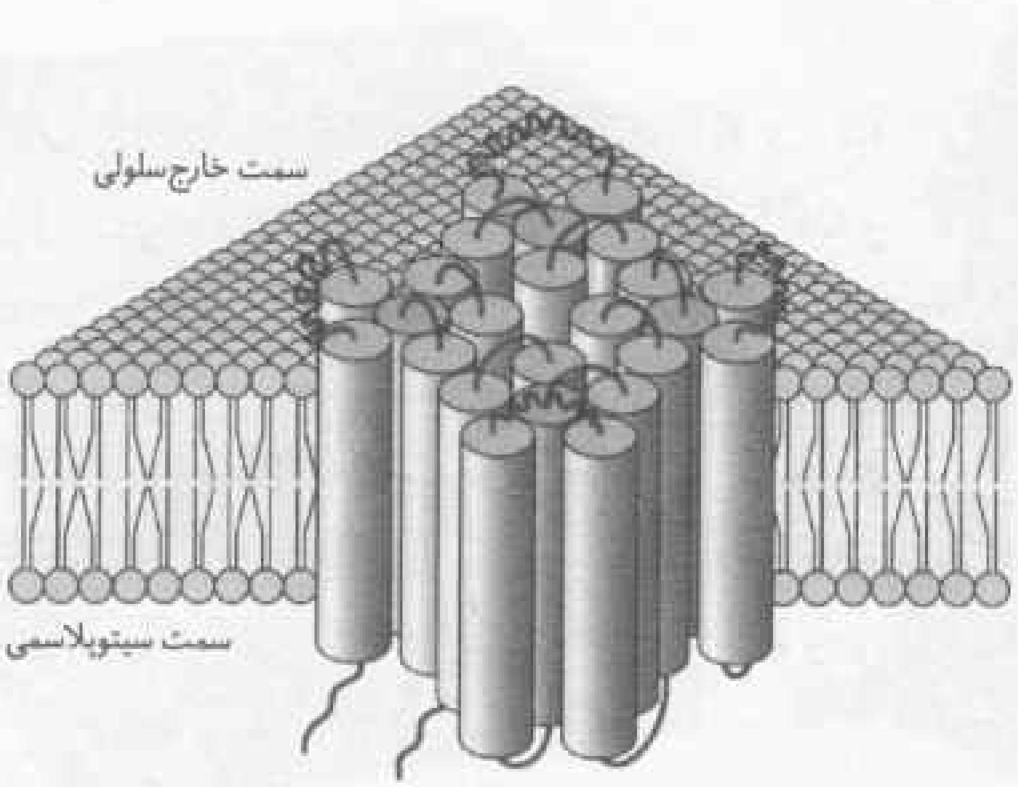
هر کانال یونی متشکل از زیرواحدهای گلیکوپروتئینی اختصاصی به‌صورت ساختمان‌های هُمو- یا هترو- اولیگومریک هستند (جدول ۱۰-۱۲). زیرواحدهای بزرگ α (حدود ۲۶۰ kDa) حاوی کانال هدایت-یون هستند. اینها چهار دومن هُمولوگوس دارند که هر کدام حاوی شش قطعه عرض‌غشایی می‌باشند که از طریق قوس‌های داخل‌سلولی و خارج‌سلولی به یکدیگر متصل شده‌اند؛ در مجموع ۲۴ قطعه عرض‌غشایی دارند (شکل ۳۷-۱۲). زیرواحدهای فرعی (β، γ و δ) فاقد ساختمان مشترک هستند؛ برخی چندین قطعه عرض غشایی دارند و بقیه پروتئین‌های محیطی هستند که کاملاً در داخل یا خارج سلول قرار گرفته‌اند. اینها معمولاً در تنظیم کانال نقش دارند؛ زیرواحدهای β ممکن است با پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی و اسکلت سلولی تعامل داشته باشند. در شکل ۳۸-۱۲ مدلی برای کانال Na^+ به نمایش گذاشته شده است. یک قطعه عرض‌غشایی یک ریشه با بار مثبت در هر موقعیت سوم دارد و ممکن است دومن حسگر-ولتاژ باشد؛ جابه‌جایی مکانیکی این قطعه ممکن است منجر به تغییر کونفورماسیون پروتئین شده که نتیجه آن بازشدن کانال

جدول ۱۰-۱۲ • ترکیب زیرواحدی کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار- ولتاژی

کانال کاتیونی	زیرواحدها
Na^+	α, β_1, and β_2
K^+	$4\alpha, \beta$
Ca^{2+}	$\alpha_1, \alpha_2\delta$, and β



شکل ۳۷-۱۲ ساختمان زیرواحدی کانال Na^+ دریچه‌دار-ولتاژی. ساختمان‌های اولیه زیرواحدهای کانال Na^+ دریچه‌دار-ولتاژی به عنوان دیاگرامی از تاشدن عرض‌غشایی شرح داده می‌شوند. استوانه‌ها اشاره به قطعات مارپیچی α دارند. استوانه‌های قرمز حسگر ولتاژ و استوانه‌های آبی قطعات موجود در منفذ هستند (شکل ۳۸-۱۲ را ببینید). خطوط ضخیم اشاره به زنجیرهای پلی‌پپتیدی هر زیرواحد دارند که طول آنها تقریباً متناسب با تعداد ریشه‌های اسید آمینه موجود در زیرنوع‌های کانال Na^+ است. دومن‌های خارج‌سلولی مربوط به زیرواحدهای β_1 و β_2 به‌صورت ساختمان‌های کروی نشان داده شده‌اند. جایگاه‌های فسفریلاسیون پروتئین نشان داده شده‌اند.



شکل ۳۸-۱۲ مدل کانال Na^+. پپتید واحد متشکل از چهار واحد تکراری که هر واحد آن به شش مارپیچ عرض‌غشایی تا شده است. قطعات عرض‌غشایی قرمز مربوط به حسگر ولتاژ هستند.

می‌باشد. برای نحوه جفت‌شدن کانال و دومن‌های حسگر ولتاژ جهت شروع بازشدن کانال، دو مکانیسم بسیار متفاوت مطرح شده است، ولی هیچکدام از آنها ثابت نشده‌اند. پروتئین غشایی مسئول جابه‌جایی پروتون‌ها حاوی دومن‌هایی برای حس تغییرات ولتاژ غشایی است، ولی یک دومن کانالی شرح داده نشده است.

کانال‌های یونی دریچه‌دار- ولتاژی می‌توانند به یکی از سه حالت کونفورماسیونی یا عملکردی وجود داشته باشند: بسته (در حال استراحت)، باز (فعال)، و بسته (غیرفعال). در پاسخ به دپولاریزاسیون غشایی، تغییری از حالت بسته به باز وجود دارد. تغییر از حالت در حال استراحت به غیرفعال، با اتصال لیگاندها و یا از طریق فسفریلاسیون پروتئینی رخ می‌دهد.

برخلاف کانال‌های کاتیونی، اطلاعات زیادی در خصوص ساختمان کانال‌های کلری دریچه‌دار-ولتاژی وجود ندارد (ص ۱۲۵۰)؛ این کانال‌ها ۱۲ قطعه مارپیچی عرض‌غشایی دارند. کانال‌های کلری حجم سلول را تنظیم می‌کنند، سبب تثبیت پتانسیل غشاء می‌شوند، در هدایت پیام نقش دارند، و انتقال ترانس‌اپی‌تلیال را تنظیم می‌کنند. تنظیم‌کننده عرض غشایی فیبروز کیستیک یک کانال Cl^- است.

در بافت‌های مختلف، کانال‌های یونی دریچه‌دار-ولتاژی یک الگوی بیانی متفاوت دارند. در انسان، تعداد قابل‌توجهی بیماری‌های ارثی کانال یونی، تحت عنوان کانالوپاتی‌ها، وجود دارند که در نتیجه جهش در کانال‌های آنیونی و کاتیونی به وجود می‌آیند (ارتباط بالینی ۸-۳ را ببینید). ارتباط بالینی ۳-۱۲ تغییرات مربوط به کانال‌های دریچه‌دار-ولتاژی را در ناهنجاری‌های عضلانی میوتونیک شرح می‌دهد.

کانال نیکوتینی استیل‌کولین (nAChR)

کانال نیکوتینی استیل‌کولین که **گیرنده استیل‌کولین** نیز نامیده می‌شود، نمونه‌ای از یک کانال تحت تنظیم لیگاند است که در آن اتصال استیل‌کولین (شکل ۳۹-۱۲) سبب بازشدن

$$CH_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}-(CH_3)_3$$

شکل ۳۹-۱۲ ساختمان استیل‌کولین.

کانال می‌شود. نام دوتایی این کانال برای تمایز این گیرنده از سایر گیرنده‌های استیل‌کولین موجود مورد استفاده قرار می‌گیرد که به شکل متفاوتی عمل می‌کنند. این کانال در سیناپس عصب-عضله بیان می‌شود (ص ۱۲۵۸) و عضوی از یک فوق خانواده کانال‌های یونی دریچه‌دار-نوروترانسمیتری است که شامل گیرنده‌های سروتونین، اسید γ-آمینوبوتیریک، و گلیسین می‌باشد (ص ۱۲۵۲). استیل‌کولین به سمت غشاء عضله اسکلتی انتشار یافته و در این محل با گیرنده استیل‌کولین تعامل می‌کند که نتیجه آن بازشدن کانال و فراهم‌سازی امکان برقراری جریان یون‌های دارای بار مثبت و غیرالکترولیت‌های کوچک، ولی نه یون‌های دارای بار منفی، می‌باشد. کمپلکس کانال متشکل از یک کمپلکس پنتامری از دو زیرواحد α و یک زیرواحد از هر کدام β، γ و δ می‌باشد (شکل ۴۰-۱۲). هر دو زیرواحد α گلیکوزیله می‌باشند و دو زیرواحد دیگر اتصال کووالان به لیپید دارند. هر زیرواحد یک انتهای آمینو و کربوکسیل خارج‌سلولی، چهار دومن پل‌زننده بر روی غشاء (**M1**، **M2**، **M3** و **M4**) همراه با یک قوس سیتوپلاسمی بلند بین **M3** و **M4** دارد که حاوی جایگاه‌های مشترک برای فسفریلاسیون توسط پروتئین کینازها می‌باشد. پنج دومن **M2** (یکی از هر زیرواحد پروتئین) که در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند، منفذ هدایت‌کننده یون را به‌وجود می‌آورند. دومن‌های **M2** مربوط به کانال‌های گیرنده انتخابی-کاتیون، نظیر گیرنده نیکوتینی استیل کولین، غنی از اسیدهای آمینه با بار منفی در «دهانه» داخل سلولی منفذ هستند. این ناحیه در جهت جذب کاتیون‌هایی مثل Na^+ و دفع آنیون‌هایی مثل Cl^- عمل می‌کند. اتصال نوروترانسمیتر به جایگاه‌های خارج‌سلولی موجود بر روی کمپلکس، تغییر آرایش بسیار کوچک دقیق دومن‌های **M2** را القاء می‌کند. این نوآرایی تقریباً لحظه‌ای، سدهای انرژتیک را در برابر جریان یونی در میان منفذ پوشیده از آب برداشت می‌کند. همچنین فسفریلاسیون زیرواحد α برای فعالیت مورد نیاز است. بسته‌شدن کانال ظرف یک میلی‌ثانیه به‌واسطه هیدرولیز سریع استیل‌کولین و جدایی محصولات، استات و کولین، از پروتئین رخ می‌دهد.

چندین نوروتوکسین مرگ‌آور، شامل ***d*-توبوکورارین**[1]، جزء فعال **کورار**[2]، و چندین سم از مارها، شامل **α-بونگاروتوکسین**[3]، **ارابوتوکسین**[4]، گیرنده نیکوتینی استیل کولین را مهار می‌کنند.

سوکسینیل‌کولین یک شل‌کننده عضلانی است که کانال منتهی به دپولاریزاسیون غشاء را باز می‌کند؛ سوکسینیل کولین در جراحی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا فعالیت آن به دلیل هیدرولیز سریع این ترکیب بعد از توقف تجویز، برگشت‌پذیر می‌باشد.

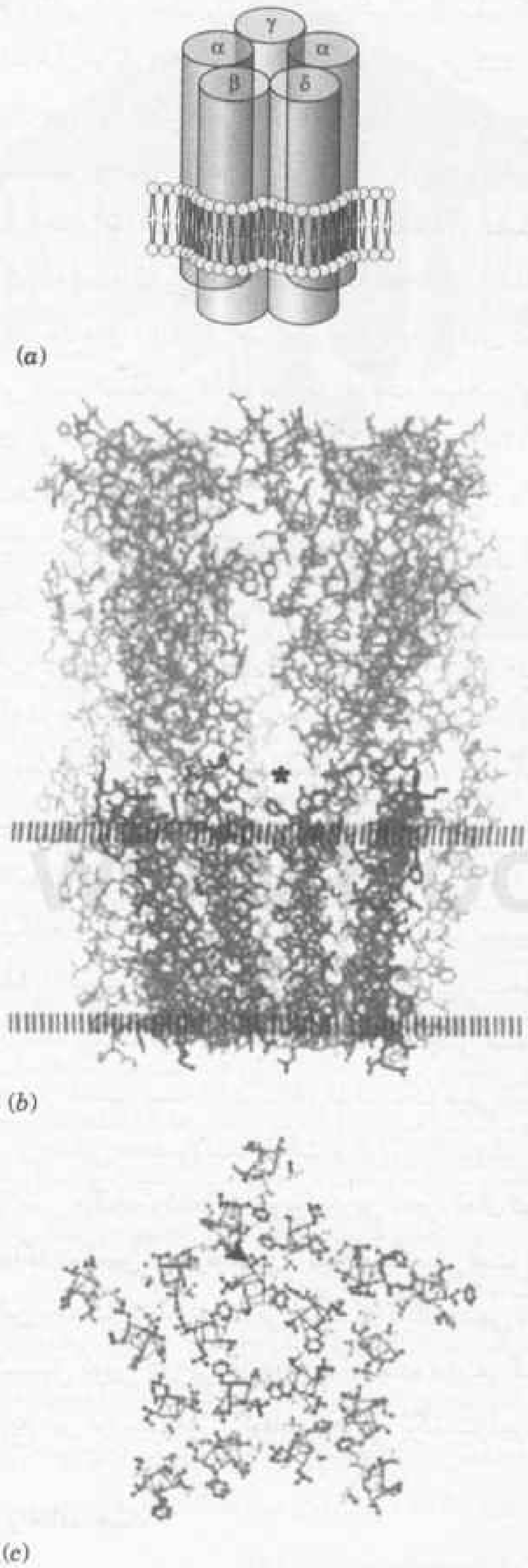
اتصالات شکافی و منافذ هسته

اتصالات شکافی[5] و منافذ هسته کانال‌های پروتئینی مولتی‌مری نسبتاً بزرگی هستند. **اتصالات شکافی** موجود در غشاءهای پلاسمایی متشکل از کانال‌های پروتئینی عرض‌غشایی هستند

1. *d*-Tubocurarin

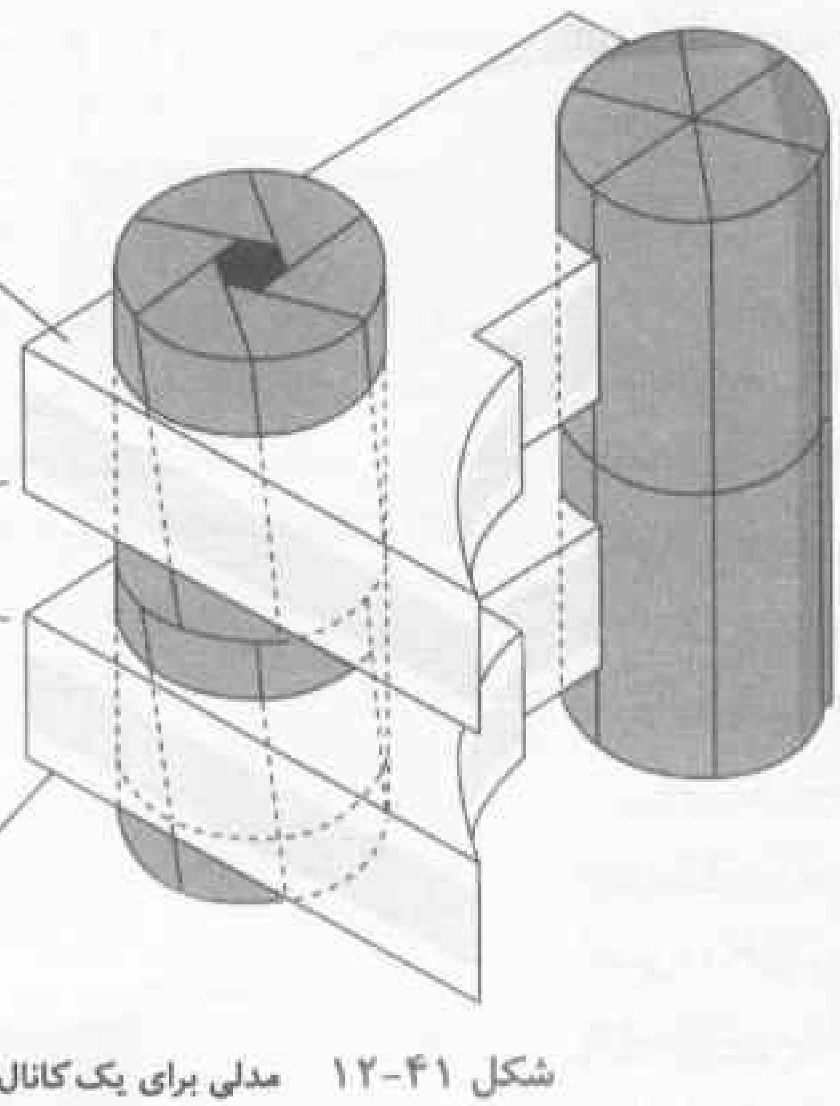
۲. **Curare**؛ هریک از انواع مختلف عصاره‌های بسیار سمّی و دارای منشاء گیاهی که ابتدا در آمریکای جنوبی برای ساخت تیرهای سمّی مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

3. α -Bungarotoxin
4. Erabutoxin
5. Gap junctions

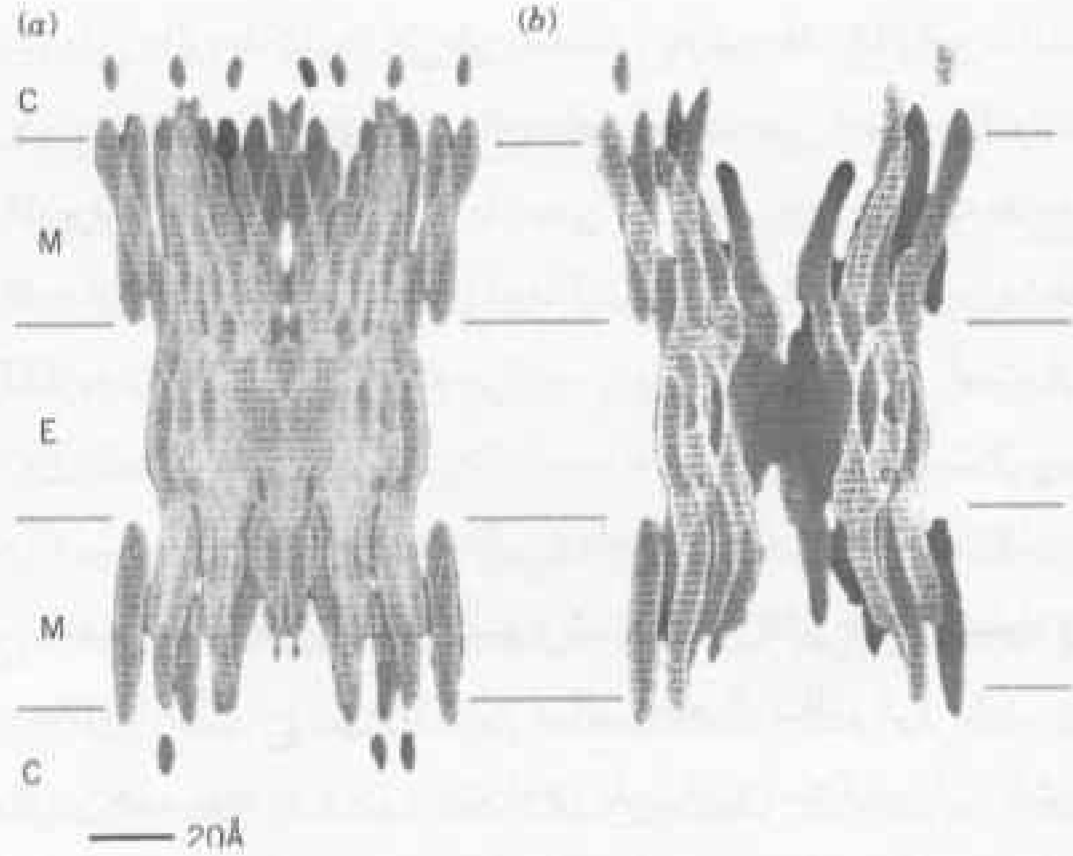


شکل ۴۰-۱۲ مدل گیرنده استیل‌کولین (ACh). (a) آرایش زیرواحدهای مربوط به گیرنده Ach و توپولوژی معمول آنها. (b) گیرنده Ach که ساختمان مارپیچی α منفذ (آبی، سمت-منفذ؛ قرمز، سمت مارپیچ‌ها) نسبت به سطوح غشایی و ساختمان صفحه β (سبز) متشکل از دومن اتصالی را نشان می‌دهد؛ ستاره اشاره به فضای باز موجود در فصل‌مشترک یک زیرواحد دارد. (c) نمای برش عرضی پنتامر در وسط غشاء که تقسیم این ساختمان به قسمت‌های منفذی و سمت- لیپیدی همراه با فضاهای میانی را نشان می‌دهد.

که تحت عنوان **کانکسون‌ها** مورد اشاره قرار می‌گیرند. کانکسون‌های موجود در یک سلول به صورت انتها به انتها به کانکسون‌های موجود در غشاء سلول مجاور اتصال یافته و تولید یک کانال اتصالی می‌کنند (شکل ۴۱-۱۲). کانکسون‌ها متشکل از پروتئین‌های هُمو-یا



شکل ۴۱-۱۲ مدلی برای یک کانال در اتصال شکافی.



شکل ۴۲-۱۲ سازماندهی ملکولی اتصال شکافی قلبی نوترکیب. این مدل براساس کریستالوگرافی الکترونی ساخته شده است. (a) نمای طرفی کامل نشان داده شده است. (b) برای نمایش داخل کانال، چگالی مشخص شده است. M، دولایه غشاء؛ E، فضای خارج‌سلولی؛ و C، فضای سیتوپلاسمی.

هترو - هگزامری **کانکسین‌ها (پروتئین‌های اتصال شکافی)** هستند. دوازده زیرواحد، شش مورد در هر سلول، یک ساختمان هگزامری در هر غشاء به‌وجود می‌آورند. بیش از ۱۵ ایزوفرم زیرواحد کانکسین شناخته‌شده می‌باشند؛ هر کدام از اینها چهار توالی عرض‌غشایی مارپیچی $-\alpha$ دارند. سازماندهی ملکولی یک اتصال شکافی نوترکیبی در شکل ۴۲-۱۲ نشان داده شده است. قطر دهانه از ۱٫۲ تا ۲ nm متفاوت است. کانال آبی جفت‌شدن الکتریکی و تبادل بین سلولی یون‌ها و متابولیت‌ها را وساطت می‌کند. اتصالات شکافی متشکل از کانکسین‌های مختلف ممکن است ویژگی‌های مختلفی برای مواد حل‌شده را نشان دهند. کانال‌ها به‌طور طبیعی باز هستند. بسته‌شدن به‌واسطه افزایش Ca^{2+} سیتوپلاسمی، تغییر در متابولیسم، کاهش پتانسیل غشایی، یا اسیدی‌شدن سیتوپلاسم، رخ می‌دهد. کنترل همچنین ممکن است به‌واسطه فاکتورهای رشد اختصاصی و فسفریلاسیون کانکسین‌ها رخ دهد. وقتی کانال باز است، به‌نظر می‌رسد که زیرواحدها قدری کج می‌شوند، ولی در زمان بسته‌بودن به نظر می‌رسد که نسبت به غشاء عمودتر می‌باشند که لغزش زیرواحدها بر روی یکدیگر را مطرح می‌کند.

کمپلکس‌های منفذ هسته همایش‌های ماکروملکولی پویایی هستند که از عرض دو غشاء پوشش هسته عبور می‌کنند. این کمپلکس‌ها کانال را برای عبور پروتئین‌ها، RNA و ملکول‌های کوچک در هر دو جهت فراهم می‌سازند. این منافذ قطر انعطاف‌پذیری در حدود ۹ تا ۲۰ nm و طول ۴۵ nm دارند. کمپلکس منفذ هسته متشکل از ۵۰ تا ۱۰۰ پروتئین، تحت عنوان نوکلئوپورین‌ها است. ملکول‌های کوچک به‌طور غیرفعال در هر دو جهت از میان

این کانال عبور می‌کنند، ولی ماکرومولکول‌ها این‌طور نیستند. پروتئین‌ها، **RNA** و ذرات ریبونوکلئوپروتئینی در هر دو جهت توسط پروتئین‌های حامل اختصاصی حمل می‌شوند. گیرنده‌های هسته‌ای، **کاریوفرین‌ها**[1]، و عوامل سیتوپلاسمی در انتقال به داخل و به خارج پروتئین‌ها نقش دارند. **کاریوفرین** β انتقال به خارج ماکرومولکول‌های متصل به نوکلئوپورین‌ها و یک پروتئین GTPase، یعنی **Ran**، را وساطت می‌کنند. پروتئین‌هایی که قرار است از سیتوپلاسم به هسته انتقال داده شوند، حاوی توالی‌های اسید آمینه‌ای کوتاهی، تحت عنوان **توالی‌های تمرکز هسته**[2] هستند که آنها را برای انتقال به داخل هسته هدفمند می‌کنند. انتقال از میان کمپلکس منفذ هسته به طریق انتشار تسهیل‌شده پروتئین‌های حامل محلول و کمپلکس‌های حامل - ماکروملکولی رخ می‌دهد. این فعالیت تحت تنظیم قرار دارد.

کمترین شناخت پورین‌ها مربوط به نوعی است که در نفوذپذیری میتوکندریایی نقش دارد. بازشدن در غشاء داخلی در پاسخ به استرس اکسیداتیو، از دست رفتن نوکلئوتیدهای آدنینی، و افزایش Ca^{2+} میتوزولی رخ می‌دهد. این ساختمان به‌خوبی مشخص نشده است. بازشدن این منفذ می‌تواند منجر به ازدست‌رفتن اجزاء ماتریکس میتوکندری و سیتوکروم c و آغاز آپوپتوز گردد (ص ۱۳۴۰). این منفذ ممکن است نقش مهمی در آسیب خونرسانی - خونرسانی مجدد[3] بعد از ایسکمی بافتی نظیر یک سکته داشته باشد.

۸-۱۲ • پروتئین‌های انتقالی غشاء

پروتئین‌های انتقالی غشاء حرکت یون‌ها و ملکول‌ها از میان یک غشاء را به‌واسطه اتصال و جابه‌جایی فیزیکی آنها در جهت دسترسی به محیط موجود در سمت مخالف غشاء تسهیل می‌کنند. لازم به ذکر است برای حرکت فیزیکی سوبسترا، لزوماً نباید پروتئین انتقال‌دهنده در عرض غشاء حرکت کند. همان‌طور که مورد بحث قرار خواهد گرفت، پروتئین می‌تواند فاصله کوتاهی سوبسترا را بین دو محیط مختلف در داخل خود حرکت دهد. در مورد اکثر مواد، سرعت انتقال وساطت‌شده به‌میزان قابل توجهی بیشتر از انتشار ساده از طریق یک غشاء لیپیدی است.

در صورتی که S_1 ماده حل‌شده در سمت ۱ و S_2 در سمت ۲ باشد، آنگاه انتقال‌دهنده، رسیدن به تعادل زیر را تسریع می‌کند:

$$[S_1] \rightleftharpoons [S_2]$$

کروشه اشاره به غلظت مواد حل‌شده دارد. در صورتی که انتقال‌دهنده T در نظر گرفته شود، واکنش به‌صورت زیر می‌شود:

$$[S_1] + T \rightleftharpoons [S-T] \rightleftharpoons [S_2] + T$$

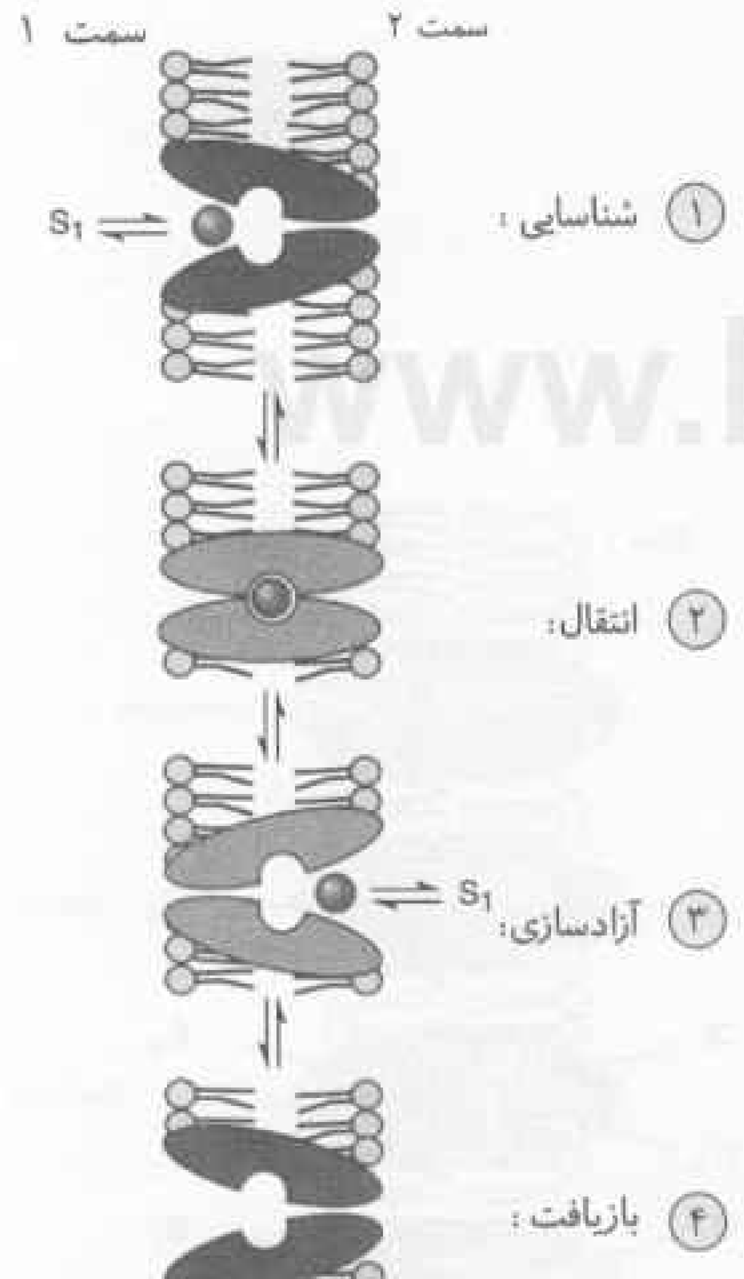
1. Karyopherins　2. Nuclear localization sequences　3. Perfusion-reperfusion

شناسایی:	$S_1 + T_1 \rightleftharpoons S-T_1$
انتقال:	$S-T_1 \rightleftharpoons S-T_2$
آزادسازی:	$S-T_2 \rightleftharpoons T_2 + S_2$
بازیافت:	$T_2 \rightleftharpoons T_1$

شکل ۴۳-۱۲ مراحل درگیر در انتقال در عرض غشاء یک غشاء بیولوژیک. S_1 و S_2 مواد موجود در به‌ترتیب سمت ۱ و ۲ غشاء هستند؛ T_1 و T_2 جایگاه‌های اتصالی موجود بر روی انتقال‌دهنده‌ها در به ترتیب سمت ۱ و ۲ هستند.

در صورتی که هیچ انرژی از منبع دیگری مصرف نشود، غلظت در دو سمت غشاء در حالت تعادل برابر خواهد بود، ولی در صورت صرف انرژی، یک شیب غلظتی بوجود خواهد آمد. همانند واکنشی که توسط یک آنزیم کاتالیز می‌شود، انتقال‌دهنده سرعت را افزایش می‌دهد، ولی تعادل نهایی را تعیین نمی‌کند. پروتئین انتقال‌دهنده در انتهای این واکنش بدون تغییر می‌باشد. فعالیت این پروتئین را می‌توان با همان اصطلاحات کینتیکی مورد استفاده در یک واکنش آنزیمی مورد ارزیابی قرار داد، زیرا برای ماده انتقالی ویژگی دارد، کینتیک آن مشخص است، یک انتقال عمودی را کاتالیز می‌کند، و تحت تأثیر مهارکننده‌های رقابتی و غیررقابتی قرار می‌گیرد. انتقال‌دهنده کینتیک حالت اشباع را نشان می‌دهد (شکل ۳۳-۱۲)، در حالی که انتشار ساده اشباع نمی‌شود. ثابت‌هایی نظیر V_{max} و K_m برای انتقال‌دهنده‌ها تعیین می‌شوند. از نظر تئوری، یک انتقال‌دهنده می‌تواند حرکت یک ماده در هر دو جهت را در عرض غشاء تسهیل کند، ولی به دلیل $\Delta G^{\circ\prime}$ بزرگ برای واکنش، در اکثر موارد یک حرکت یک‌طرفه وجود دارد.

اکثر انتقال‌دهنده‌ها شدت بالایی از ویژگی ساختمانی و فضایی برای سوبسترا را نشان می‌دهند. در انتقال وساطت‌شده D-گلوکز در گلبول‌های قرمز، K_m برای D-گالاکتوز ۱۰ برابر و برای L-گلوکز ۱۰۰۰ برابر بیشتر است که تمایل بسیار کمتر برای D-گالاکتوز و L-گلوکز را نشان می‌دهد. این انتقال‌دهنده فعالیتی بر روی D-فروکتوز یا دی‌ساکاریدها ندارد. آنالوگ‌های ساختمانی سوبسترا سبب مهار رقابتی انتقال‌دهنده می‌شوند و معرف‌هایی که با گروه‌های اختصاصی بر روی پروتئین‌ها واکنش می‌کنند، مهارکننده‌های غیررقابتی هستند.

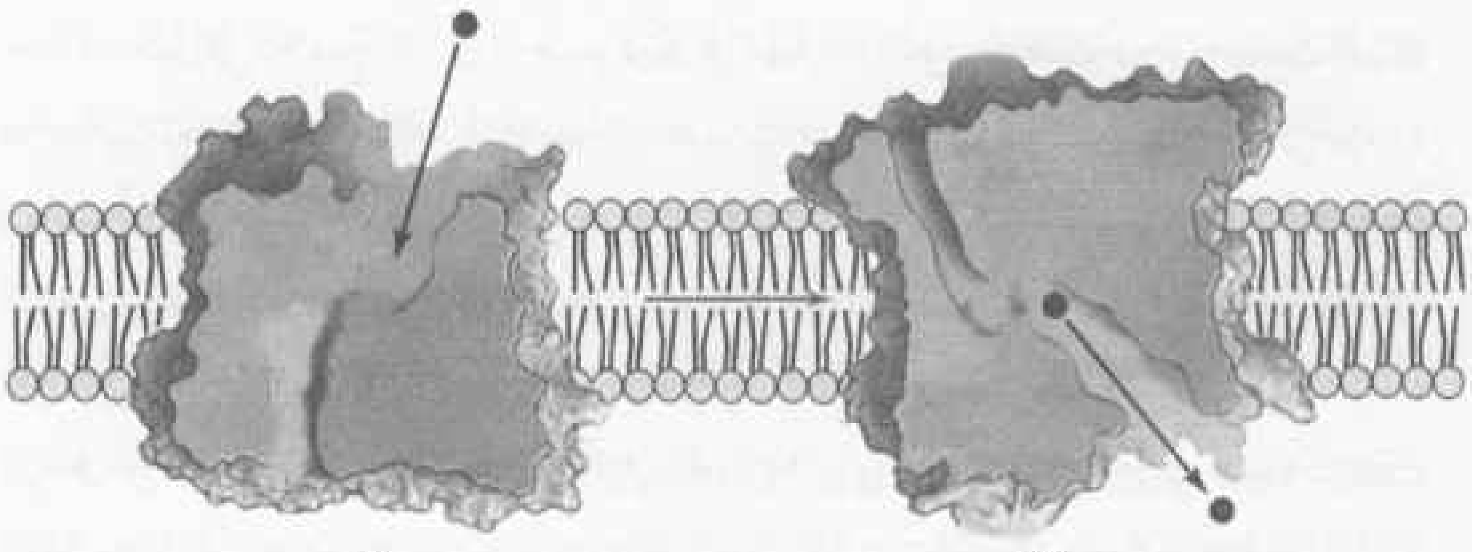


شکل ۴۴-۱۲ مدلی برای سیستم انتقالی وساطت‌شده در یک غشاء بیولوژیک. این مدل براساس مفهوم جایگاه‌های اختصاصی برای اتصال سوبسترا و یک تغییر کونفورماسیونی در انتقال‌دهنده در جهت حرکت ماده اتصال‌یافته به یک فاصله کوتاه، ولی به داخل محیطی در سمت دیگر غشاء. بعد از عبور، ماده از انتقال‌دهنده جدا می‌شود.

چهار مرحله در انتقال ملکول‌های حل‌شده

چهار مرحله در انتقال وساطت‌شده وجود دارد (شکل ۴۳-۱۲): (۱) شناسایی ماده مناسب در میان انواع مختلف مواد موجود در محیط آبی توسط انتقال‌دهنده، (۲) جابه‌جایی ماده، (۳) آزادسازی ماده توسط انتقال‌دهنده، و (۴) برگشت انتقال‌دهنده به وضعیت ابتدایی.

اولین مرحله، **شناسایی** یک سوبسترای اختصاصی توسط انتقال‌دهنده، همانند شناسایی یک سوبسترا توسط یک آنزیم است (ص ۵۲۴). جایگاه‌های اتصالی اختصاصی موجود بر روی پروتئین، ساختمان صحیح ماده را شناسایی می‌کنند. مرحله دوم، **جابه‌جایی**، نیاز به یک تغییر کونفورماسیونی در انتقال‌دهنده بعد از اتصال سوبسترا دارد (شکل ۴۴-۱۲)، که سوبسترا را به فاصله کوچکی، احتمالاً تنها ۲ یا ۳Å به سمت محیط موجود در آن سمت غشاء، حرکت می‌دهد. لزومی ندارد که انتقال‌دهنده ملکول را در تمامی فاصله موجود در عرض غشاء حرکت دهد (شکل ۴۵-۱۲). تغییر کونفورماسیونی پروتئین برای تغییر محیط کافی است. مرحله ۳، **آزادسازی** سوبسترا، بستگی به تمایل انتقال‌دهنده برای سوبسترا دارد. در صورتی که غلظت سوبسترا در محیط جدید کمتر از محیط ابتدایی باشد، به دلیل تغییر در تعادل بین سوبسترای اتصال‌یافته و آزاد، بدون تغییر در تمایل (K_{eq}) برای سوبسترا،

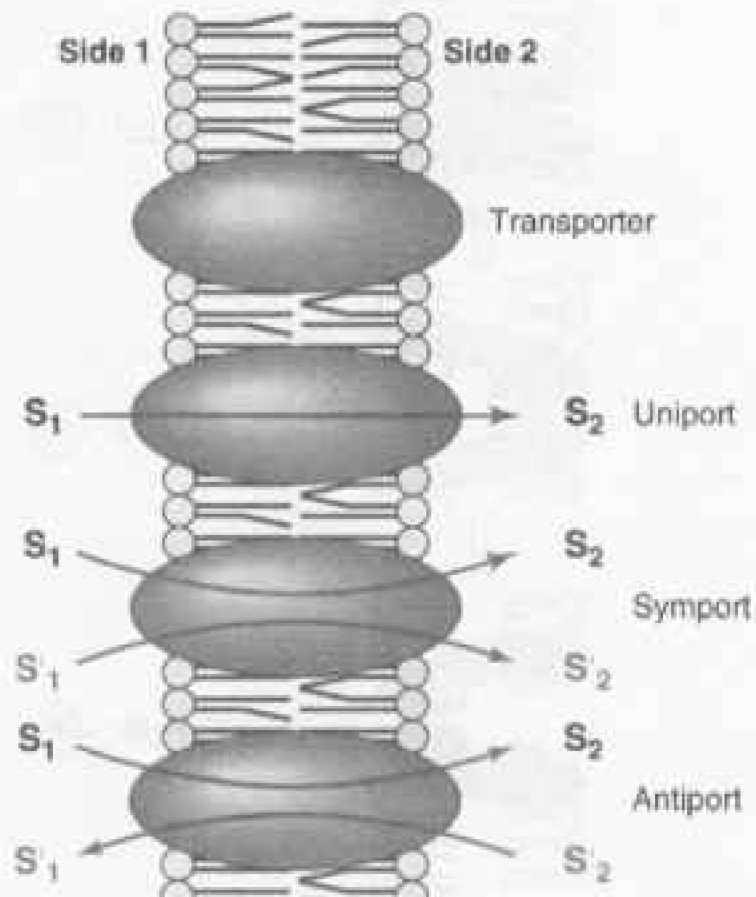


شکل ۴۵-۱۲ انتقال یک ماده از میان یک غشاء. بعد از اتصال سوبسترا به یک سمت غشاء، یک تغییر کونفورماسیونی در پروتئین رخ می‌دهد که سوبسترا را به محیط موجود در سمت مخالف انتقال می‌دهد.

سوبسترا در محیط جدید آزاد خواهد شد. برای انتقال‌دهنده‌ای که سوبسترا را در خلاف جهت شیب غلظتی انتقال می‌دهد، آزادسازی سوبسترا در غلظت‌های بالاتر نیاز به تغییر انتقال‌دهنده به طریقی دارد که تمایل آن برای سوبسترا کمتر (K_m بیشتر) شود. یک تغییر کونفورماسیونی انتقال‌دهنده می‌تواند منجر به کاهش در تمایل شود. بالاخره، در مرحله بازیافت، انتقال‌دهنده با آزادسازی به کونفورماسیون ابتدایی خود برمی‌گردد.

این بحث مربوط به حرکت یک سوبسترا توسط یک انتقال‌دهنده (مکانیسم **تک‌انتقالی**[1]) بود. سیستم‌هایی وجود دارند که دو سوبسترا را به‌طور همزمان در یک جهت (**هم‌انتقالی همسو**[2]) یا در دو جهت مخالف (**هم‌انتقالی ناهمسو**[3]) انتقال می‌دهند (شکل ۴۶-۱۲).

وقتی یک ماده باردار جابه‌جا می‌شود و هیچ یونی با بار مخالف انتقال داده نمی‌شود و یا دو ملکول با بارهای مخالف با یک مکانیسم هم‌انتقالی ناهمسو انتقال داده نمی‌شوند، جداسازی بار در عرض غشاء رخ می‌دهد. این مکانیسم را **انتقال الکتروژنیک**[4] گویند که منجر به ایجاد یک پتانسیل غشایی می‌شود. در صورتی که یک یون با بار مخالف حرکت می‌کند تا بار را متعادل سازد و یا دو ملکول با یک بار در جهت‌های مخالف در عرض غشاء جابه‌جا می‌شوند، این مکانیسم را **انتقال خنثی یا خاموش از نظر الکتریکی**[5] گویند.



شکل ۴۶-۱۲ مکانیسم‌های تک‌انتقالی، هم‌انتقالی همسو، و هم‌انتقالی ناهمسو برای جابه‌جایی مواد. S و S′ اشاره به ملکول‌های متفاوتی دارند.

انرژتیک سیستم‌های انتقال غشایی

معادله ۲-۱۲ تغییر انرژی آزاد در هنگام حرکت ملکول بدون بار از غلظت C_1 به غلظت C_2 در سمت دیگر یک غشاء را نشان می‌دهد.

$$\Delta G' = 2.3RT\log\left(\frac{C_2}{C_1}\right) \qquad (۱۲-۲)$$

وقتی $\Delta G'$ منفی است-یعنی، آزادسازی انرژی آزاد وجود دارد-حرکت ماده بدون نیاز به انرژی مساعدکننده انجام می‌شود. وقتی $\Delta G'$ مثبت است، همانند حالتی‌که در آن C_2

1. Uniport 2. Symport 3. Antiport 4. Electrogenic transport 5. Neutral or electrically silent transport

بیش از C_1 می‌باشد، آنگاه نیاز به دادن انرژی برای انجام انتقال می‌باشد. همان‌طور که در معادله ۳-۱۲ نشان داده شده است، برای یک ملکول باردار (برای مثال، Na^+)، هم پتانسیل الکتریکی و هم غلظت ماده در محاسبه تغییر انرژی آزاد نقش دارند.

$$\Delta G' = 2.3\, RT \log\left(\frac{C_2}{C_1}\right) + Z\mathscr{F}\,\Delta\psi \qquad (۱۲\text{-}۳)$$

که در آن $\Delta G'$ پتانسیل الکتروشیمیایی، Z بار ماده انتقالی، $\mathscr{F}$ ثابت فارادی (kJ/V/mol ۹۶٫۴۹، kcal/V/mol ۲۳٫۰۶)، و $\Delta\psi$ تفاوت پتانسیل الکتریکی برحسب ولت در عرض غشاء می‌باشد. بزرگی و علامت Z و $\Delta\psi$ بر روی $\Delta G'$ تأثیر می‌گذارند. وقتی $\Delta G'$ منفی است، حرکت ماده به‌طور خود به خودی انجام می‌شود؛ اغلب به این انتقال غیرفعال گفته می‌شود. وقتی $\Delta G'$ مثبت است، برای انتقال نیاز به دادن انرژی است و به این فرایند انتقال فعال گفته می‌شود.

در سلول‌های پستانداران انتقال نیازمند انرژی، از طریق هیدرولیز نوکلئوزید تری‌فسفات (برای مثال، ATP ← ADP + انرژی) یا مصرف شیب الکتروشیمیایی Na^+ (**نیروی محرک سدیمی**[1]، SMF) یا H^+ (**نیروی محرک پروتونی**[2]، PMF) مساعدت می‌شود. همچنین پروکاریوت‌ها انتقال‌دهنده‌هایی دارند که از طریق واکنش‌های دکربوکسیلاسیون یا انتقال متیل عمل می‌کنند و گیاهان دارای انتقال‌دهنده‌هایی هستند که به کمک جذب نور عمل می‌کنند. SMF به قیمت هیدرولیز ATP و PMF به‌واسطه واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء عمل می‌کند (ص ۷۷۵). مهار سنتز ATP یا از بین رفتن PMF منجر به از بین رفتن شیب Na^+ و یا H^+ می‌شود که انتقال را متوقف می‌سازد.

در ساده‌ترین مکانیسم انتقالی، یعنی انتقال یک ماده با یک مکانیسم تک‌انتقالی، در صورتی‌که ملکول‌ها باری نداشته باشند در جهت شیب شیمیایی خود و در صورت داشتن بار در جهت شیب الکتروشیمیایی خود انتقال داده می‌شوند؛ این نوع انتقال را اغلب **انتشار به‌واسطه پروتئین**[3] یا **انتشار تسهیل‌شده**[4] گویند. این انتقال‌دهنده‌ها قادر به ایجاد شیب غلظتی ماده در عرض غشاء نیستند. در یک هم‌انتقالی همسو (انتقال همزمان دو ماده در یک جهت) یا یک هم‌انتقالی ناهمسو (انتقال همزمان دو ماده در جهت‌های مخالف)، حرکت یکی از مواد در جهت شیب غلظتی خود، می‌تواند جابه‌جایی ملکول دیگر را سبب شود. اینها را **انتقال‌دهنده‌های فعال ثانویه** گویند تا از انتقال‌دهنده‌های فعال اولیه‌ای تمایز داده شوند که انرژی حاصل از متابولیسم سلولی را مصرف می‌کنند. از شیب غلظتی بالای Na^+ در عرض غشاء پلاسمایی (غلظت خارج‌سلولی بالا و داخل سلولی پایین؛ شکل ۹-۱) برای جابه‌جایی قندها و اسیدهای آمینه توسط یک مکانیسم هم‌انتقالی همسو به داخل سلول استفاده می‌شود.

برخی انتقال‌دهنده‌ها شیب‌های غلظتی بسیار بالایی را به وجود می‌آورند، نظیر انتقال-

1. Sodium motive force 2. Proton motive force 3. Protein-mediated diffusion 4. Facilitated diffusion

دهنده غشاء پلاسمایی که شیب Na^+ و K^+ را حفظ می‌کند (ص. ۶۶۵). مثال برجسته دیگر، انتقال‌دهنده فعال موجود در سلول‌های پاریتال غدد معده است که مسئول ترشح HCl به‌داخل مجرای معده می‌باشند (ص ۱۳۸۳). pH پلاسمایی حدود ۷٫۴ ($۴\times۱۰^{-۸}MH^+$) است و pH مجرایی معده می‌تواند به ۰٫۸ ($۰٫۱۵MH^+$) برسد. H^+ در برابر یک شیب غلظتی بیش از ۱×۱۰^۶ انتقال داده می‌شود. با فرض اینکه هیچ جزء الکتریکی وجود ندارد، انرژی ترشح H^+ در این شرایط براساس معادله ۱-۱۲ محاسبه می‌شود که برابر ۳۸ kJ mol/L (۹٫۱ kcalmol/L) HCl می‌باشد.

انتقال‌دهنده‌های موجود در غشاء پستانداران

دو کلاس پروتئینی اصلی انتقال‌دهنده‌های موجود در سلول‌های پستانداران عبارتند از (جدول ۸-۱۲ را ببینید)

- **انتقال‌دهنده‌های استفاده‌کننده از پتانسیل الکتروشیمیایی**[1] که سوبسترای خود را با استفاده از شیب غلظتی سوبسترا یا ماده دیگر در عرض غشاء انتقال می‌دهند، و
- **انتقال‌دهنده‌های فعال اولیه** که نیاز به دادن انرژی متابولیکی جهت حرکت سوبسترا دارند.

سلول‌های پستانداران انواع مختلفی از انتقال‌دهنده‌ها را دارند و در بسیاری از موارد از زیرخانواده‌های مختلف انتقال‌دهنده‌ها برای جابه‌جایی یک سوبسترا براساس نیازهای اختصاصی سلول یا بافت بهره می‌برند. این سیستم‌های انتقالی در غشاءهای پلاسمایی و غشاءهای داخل سلولی، شامل میتوکندری‌ها، لیزوزوم‌ها، پراکسی‌زوم‌ها، و آندوزوم‌ها، وجود دارند. تعداد انتقال‌دهنده‌های فعال موجود در یک غشاء در یک زمان خاص، حداکثر سرعت برداشت توسط یک سلول یا اندامک را تعیین می‌کند. لذا در بسیاری از موارد، سنتز انتقال‌دهنده پروتئینی و قرارگیری در داخل یک غشاء، غلظت یک سوبسترای خاص را در یک سلول یا بخش سلولی تعیین می‌کند. تمامی این سیستم‌های جابه‌جایی تحت تنظیم قرار دارند و امکان کنترل لحظه به لحظه انتقال را فراهم می‌سازند. بسیاری از بیماری‌های ژنتیکی با نقص‌هایی در سیستم‌های انتقالی مختلف مرتبط هستند (ارتباط بالینی ۴-۱۲).

۹-۱۲ • انتقال‌دهنده‌های استفاده‌کننده از پتانسیل الکتروشیمیایی

انتقال‌دهنده‌های استفاده‌کننده از پتانسیل الکتروشیمیایی به طرق مختلفی عمل می‌کنند

۱. یک مکانیسم تک‌انتقالی که در آن یک ماده به طریق انتشار، یا در صورت باردار بودن این ماده، به طریق وابسته به پتانسیل غشایی انتقال داده می‌شود؛
۲. یک مکانیسم تک‌انتقالی که در آن دو یا چند ماده طی یک فرایند شدیداً جفت‌شده بدون مصرف هر شکلی از انرژی غیر از شیب پتانسیل - الکتروشیمیایی در جهت‌های مخالف

1. Electrochemical-potential-driven transporters

ارتباط بالینی ۴-۱۲

بیماری‌های ناشی از نقص در سیستم‌های انتقال غشاء

تعدادی از حالات پاتولوژیک ناشی از تغییراتی در یک سیستم انتقالی برای اجزاء سلولی اختصاصی هستند. افراد مبتلا به‌کاهش برداشت گلوکز از مجرای روده، فاقد انتقال‌دهنده اختصاصی گلوکز-گالاکتوز جفت‌شونده با سدیم هستند. سندروم‌های سوء جذب فروکتوز در اثر ایجاد تغییراتی در فعالیت سیستم انتقالی فروکتوز حاصل می‌شوند. در بیماری هارتناپ، کاهش انتقال اسیدهای آمینه خنثی در سلول‌های اپی‌تلیال روده و توبول‌های کلیه وجود دارد.

در سیستینوری، بازجذب کلیوی سیستین و اسیدهای آمینه بازی لیزین، آرژینین و اورنیتین غیرطبیعی است که منجر به تولید سنگ‌های کلیوی سیستینی می‌شود. در راشیتیسم هیپوفسفاتمیک مقاوم به ویتامین D، جذب فسفات غیرطبیعی است. اخیراً گزارشاتی در خصوص بیماری‌های ژنتیک-محور شده است که مرتبط با انتقال‌دهنده‌های سوبسترایی مربوط به دوپامین و کراتین، و انتقال‌دهنده میتوکندریایی آسپارتات گلوتامات می‌باشند. انتقال‌دهنده‌های فعال مختلف فعال نیازمند ATP در تعدادی از حالات پاتوفیزیولوژیک نقش داشته‌اند.

انتقال داده می‌شوند؛ شیب موجود در عرض غشاء یک ماده می‌تواند حرکت ماده دیگر را سبب شود.

۳. یک مکانیسم هم‌انتقالی همسو که در آن دو یا چند گونه با یکدیگر طی یک فرایند جفت‌شده در یک جهت منتقل می‌شوند که هیچ شکلی از انرژی غیر از شیب پتانسیل-الکتروشیمیایی یک ماده را مصرف نمی‌کند؛ شیب یک ماده حرکت ماده دیگر را سبب می‌شود.

صدها مورد از این انتقال‌دهنده‌ها گزارش شده‌اند که بسیاری از آنها مختص باکتری‌ها بوده و ویژگی برای یون‌های معدنی، قندها، اسیدهای آمینه و سایر ترکیبات واسط متابولیکی دارند. جدول ۱۱-۱۲ انواع مختلف مواد انتقال‌یافته در سلول‌های اوکاریوتی را با این مکانیسم شرح می‌دهد. بسیاری از این انتقال‌دهنده‌ها ۲ تا ۲۴ توالی مارپیچی α عرض‌غشایی فرضی دارند. انتقال‌دهنده‌های استفاده‌کننده از پتانسیل الکتروشیمیایی کینتیک اشباع، ویژگی سوبسترای انتقالی در عرض غشاء و ویژگی مهارکننده‌ها را نشان می‌دهند.

نمونه‌هایی از انتقال‌دهنده‌های استفاده‌کننده از پتانسیل الکتروشیمیایی

گلوکز با یک مکانیسم تک‌انتقالی غیرفعال جابه‌جا می‌شود

خانواده‌ای از **انتقال‌دهنده‌های گلوکز** (GLUT)[1] انتقال D-گلوکز در عرض غشاءهای پلاسمایی مربوط به سلول‌های پستانداران را با یک مکانیسم تک‌انتقالی تسهیل می‌کند. ژن‌های مربوط به خانواده GLUT به شکل اختصاصی بافت بیان می‌شوند. انتقال‌دهنده‌های گلوکز که به صورت GLUT1، GLUT2 و غیره نشان داده می‌شوند (جدول ۱۲-۱۲)، همگی ۱۲ قطعه عرض‌غشایی، با تشابه توالی اسید آمینه‌ای، دارند. اکثر اینها در غشاء پلاسمایی

1. Glucose transporter

جدول ۱۱-۱۲ • نمونه‌هایی از سوبستراهای مربوط به پروتئین‌های انتقالی غشایی موجود در گلبول‌های قرمز

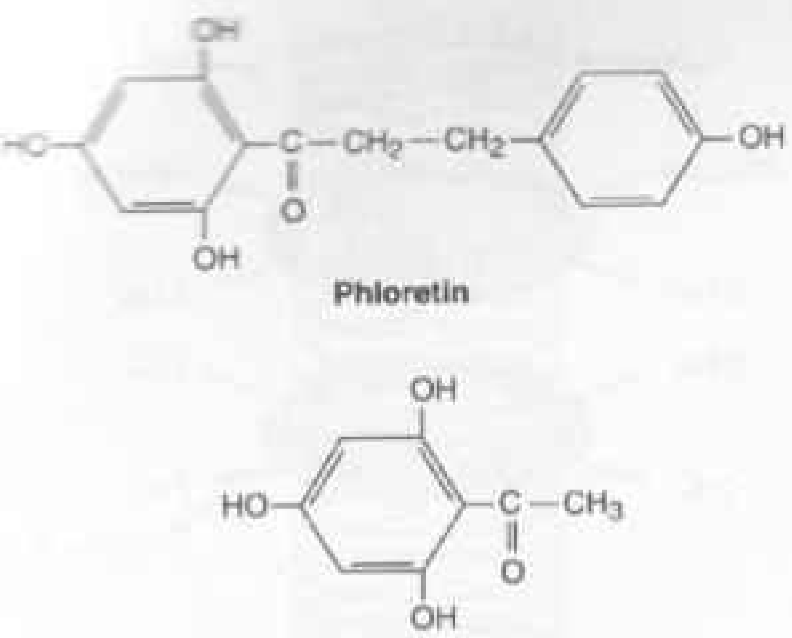
کاتیون‌های معدنی	H^+، K^+، Na^+، NH_4^+، Ca^{2+}، Co^{2+}، Cu^{2+}، Fe^{2+}، Mg^{2+}، Zn^{2+}
آنیون‌های معدنی	Cl^-، HCO_3^-، SO_4^{2-}، یُدید، فسفات، ارسنیت
قندها	فروکتوز، گلوکز، هگزوزها، لاکتوز، مالتوز، میو- اینوزیتول
اسیدهای آلی	استات، اسیدهای صفراوی، بیلی‌روبین، سیترات، گلوکز ۶-فسفات، α-کتوگلوتارات، لاکتات، مالات، اگزالواستات، پروستاگلاندین‌ها
اسیدهای آمینه	زنجیرهای اسیدی، بازی، خنثی، شاخه‌دار
پپتیدها/ پروتئین‌ها	برخی
نوکلئوزیدها/ نوکلئوتیدها	ATP، ADP، تمامی موارد دیگر
ویتامین‌ها/ کوفاکتورها	آسکوربات، بیوتین، فولات، لیپوات، تیامین
داروها	داروهای متعدد

جدول ۱۲-۱۲ • ایزوفرم‌های اصلی انتقال‌دهنده گلوکز

ایزوفرم	بافت	موقعیت سلولی	نکات
GLUT1	عضله قلب سدخونی- مغزی سلول‌های گلیال جفت	غشاء پلاسمایی	فعالیت در عضله توسط انسولین، هیپوکسی و رژیم *غذایی افزایش می‌یابد.*
GLUT2	کبد کلیه جفت	غشاء پلاسمایی	
GLUT3	مغز کلیه جفت	غشاء پلاسمایی	
GLUT4	عضله چربی قلب بلاستوسیست‌ها	غشاء پلاسمایی	فعالیت در عضله و بافت چربی، توسط انسولین و در عضله با هیپوکسی و رژیم غذایی تحریک می‌شود
GLUT5	عضله اسپرماتوزوا	وزیکول‌های سارکولما	فروکتوز به‌عنوان سوبسترا

قرار دارند که در آن جهت حرکت گلوکز معمولاً از خارج به داخل است. گرچه برحسب شیب غلظتی، **GLUT1** گلبول قرمز انتقال در هر دو جهت را تسهیل می‌کند که قابلیت برگشت سیستم را نشان می‌دهد. سه انتقال‌دهنده با تمایل-بالا (**GLUT1**، **GLUT3** و **GLUT4**)

در آزمایشگاه با سرعت نزدیک به حداکثر فعالیت می‌کنند، زیرا K_ms آنها کمتر از غلظت طبیعی گلوکز خون می‌باشد. D-گلوکز، D-مانوز، D-ارابینوز، و چندین قند D دیگر به همراه گلیسرول توسط برخی ایزوفرم‌ها انتقال داده می‌شوند. **GLUT5** غشاءهای سارکو-پلاسمی عضله اسکلتی ترجیحاً فروکتوز را انتقال می‌دهد. **GLUT1** برای تأمین گلوکز گلبول‌های قرمز و سلول‌های مغز مهم می‌باشد. سرعت برداشت گلوکز توسط **GLUT2** تمایل-پایین به‌طور موازی با افزایش غلظت گلوکز خون افزایش می‌یابد که نقش اساسی در جذب روده‌ای قندها دارد (ص.۱۳۹۴). در سلول‌های کبدی، **GLUT2** هر دو جریان رو به داخل و رو به خارج گلوکز را کاتالیز می‌کند و در انتقال به خارج گلوکز نقش دارد (ص.۸۰۶)؛ در سلول‌های β پانکراس، **GLUT2** در احساس میزان گلوکز خون نقش دارد. **GLUT4** انتقال‌دهنده‌ای است که در بافت چربی، عضله قلب و عضله اسکلتی به انسولین پاسخ می‌دهد (ص ۸۰۳). فعالیت برخی انتقال‌دهنده‌های موجود در عضله به شکل واضحی با فعالیت و هیپوکسی افزایش می‌یابد که به دلیل نیاز به افزایش مصرف گلوکز توسط بافت می‌باشد. چندین آنالوگ قندی و همچنین فلورتین و ۲،۴،۶-تری‌هیدروکسی استوفنون (شکل ۴۷-۱۲) مهارکننده‌های رقابتی هستند.


Phloretin

2,4,6-Trihydroxyacetophenone

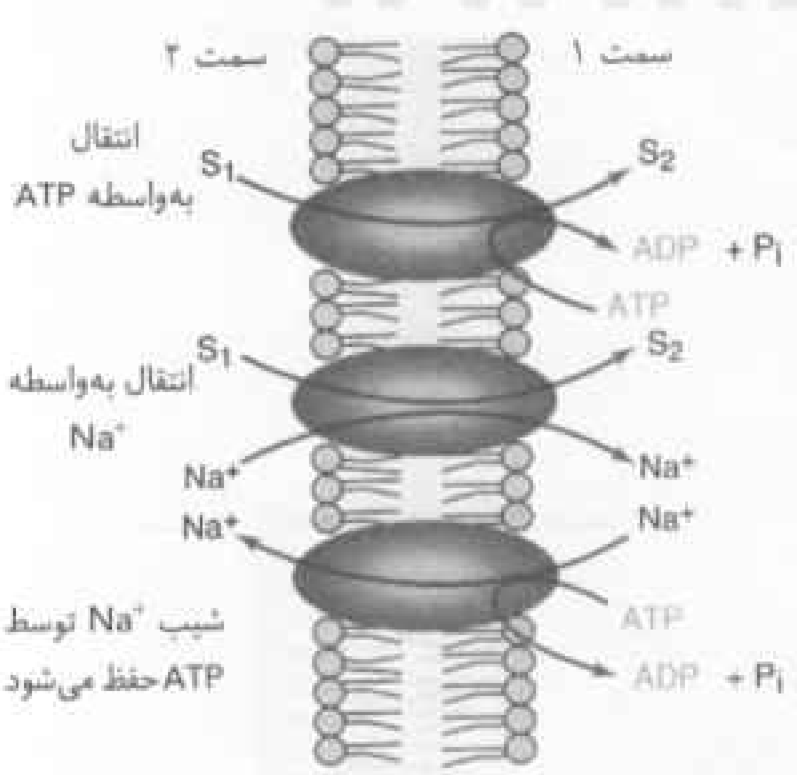
شکل ۴۷-۱۲ مهارکننده‌های انتقال غیرفعال D-گلوکز در گلبول‌های قرمز.

گلوکز و اسیدهای آمینه با یک مکانیسم هم‌انتقالی همراه با Na^+ جابه‌جا می‌شوند

شیب الکتروشیمیایی Na^+ (**نیروی محرک سدیم، SMF**) در عرض غشاء پلاسمایی (ص ۲۱)، یک منبع انرژی برای هم‌انتقالی همسوی Na^+ با قندها، اسیدهای آمینه، یون‌ها و سایر ملکول‌های کوچک می‌باشد. بیش از ۴۰۰ انتقال‌دهنده بیان‌شده در این خانواده پروتئین‌ها وجود دارد. همان‌طور که قبلاً (ص ۶۶۱) اشاره شد، **SMF** حاصل از انتقال Na^+ با هیدرولیز ATP جفت می‌شود (شکل ۴۸-۱۲)؛ مهارسنتز ATP منجر به از بین رفتن این شیب Na^+ و توقف انتقال می‌شود.

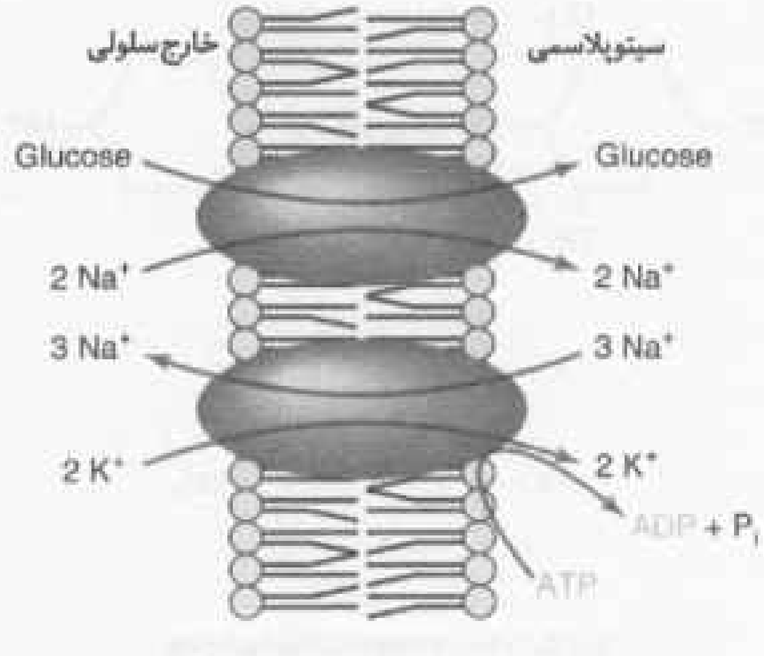
مکانیسم عمومی **هم‌انتقالی همسوی سدیم/گلوکز**[1] **(SGLT)** در شکل ۴۹-۱۲ نشان داده شده است. این شکل انتقال D-گلوکز به کمک حرکت Na^+ را نمایش می‌دهد. در این فرایند، دو Na^+ به‌طریق انتقال تسهیل‌شده غیرفعال در جهت شیب الکتروشیمیایی Na^+ وارد سلول شده و همراه با گلوکز در خلاف شیب غلظتی خود حمل می‌شود. به این طریق شیب Na^+ از بین می‌رود، ولی ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+ به‌طور مداوم آن را دوباره برقرار می‌کند (ص ۶۶۸). لذا انرژی متابولیکی به شکل ATP به‌طور غیرمستقیم در این انتقال نقش دارد، زیرا برای حفظ شیب Na^+ مورد نیاز است. مهار ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+ منجر به کاهش شیب Na^+ و بنابراین مهار برداشت گلوکز با این مکانیسم می‌شود.

بیش از ۳۷ عضو خانواده ژنی SGLT در سلول‌های حیوانی، مخمر، و باکتری‌ها مورد



شکل ۴۸-۱۲ نقش انرژی متابولیکی (ATP) در سیستم‌های انتقالی وساطت‌شده فعال. انرژی شیمیایی حاصل از هیدرولیز ATP به ADP و فسفات معدنی برای کشاندن انتقال مواد مختلف، شامل Na^+ مورد استفاده قرار می‌گیرد. شیب غلظتی عرض‌غشایی Na^+ به مصرف انتقال فعال مواد به‌واسطه مکانیسم‌های هم‌انتقالی همسو و ناهمسو (نشان داده نشده است) می‌رسد.

1. Sodium/glucose cotransporter



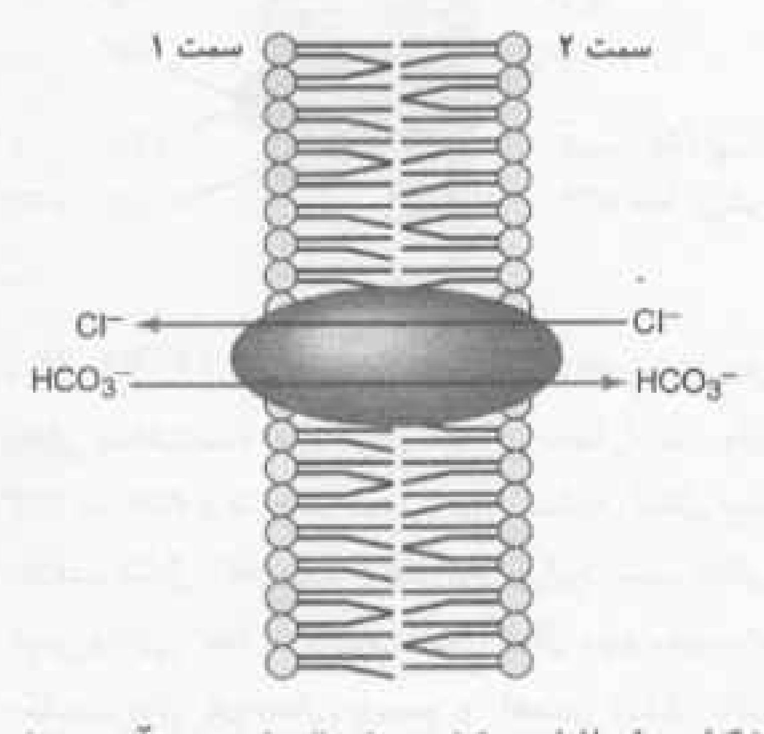
شکل ۴۹-۱۲ انتقال وابسته به Na^+ گلوکز در عرض غشاء پلاسمایی توسط یک مکانیسم هم‌انتقالی همسو.

شناسایی قرار گرفته است؛ چهار مورد از اینها در انسان بیان می‌شوند. برخی ایزوفرم‌ها در توبول‌های پروگزیمال کلیوی اپی‌تلیوم روده کوچک بیان می‌شوند (ص ۱۳۸۲). تمامی SGLTها یک ساختمان مرکزی مشترک با ۱۳ مارپیچ عرض‌غشایی دارند، ولی ایزوفرم‌های مختلف دارای قطعات عرض‌غشایی دیگری هستند، مثل SGLT1 که ۱۴ قطعه دارد. SGLTها می‌توانند حرکت تک‌انتقالی Na^+ و آب را در غیاب گلوکز انجام دهند. Na^+ به حفره خارج‌سلولی انتقال‌دهنده اتصال یافته و یک تغییر کونفورماسیونی را القاء می‌کند که تمایل انتقال‌دهنده به گلوکز را افزایش می‌دهد. اتصال گلوکز، تشکیل یک کمپلکس سه‌تایی، تغییر کونفورماسیونی دیگری را القاء می‌کند که Na^+ و سوبسترا را در معرض حفره‌ای در پروتئین مجاور با محیط داخل‌سلولی در سمت سمت دیگر غشاء قرار می‌دهد. به‌دلیل غلظت پایین Na^+ داخل‌سلولی، Na^+ از انتقال‌دهنده جدا شده و انتقال‌دهنده به کونفورماسیون ابتدایی خود برمی‌گردد که تمایل آن برای گلوکز کم است. لذا گلوکز آزاد می‌شود. انتقال‌دهنده خالی دوباره در داخل غشاء تغییر موقعیت داده و اجازه آغاز دور بعدی را می‌دهد.

اسیدهای آمینه توسط **انتقال‌دهنده‌های Na^+/اسید آمینه** با یک مکانیسم هم‌انتقالی همسو انتقال داده می‌شوند؛ حداقل هفت انتقال‌دهنده برای کلاس‌های مختلف اسیدهای آمینه (ص ۱۰۴) مورد شناسایی قرار گرفته است. از شیب Na^+ موجود در عرض غشاء پلاسمایی همچنین برای انتقال سایر یون‌ها، شامل یک مکانیسم هم‌انتقالی برای برداشت Cl^- و مکانیسم هم‌انتقالی ناهمسو برای دفع Ca^{2+}، استفاده می‌شود.

Cl^- و HCO_3^- با مکانیسم هم‌انتقالی ناهمسو انتقال داده می‌شوند

یک انتقال‌دهنده آنیونی در گلبول‌های قرمز و کلیه‌ها، حرکت تک‌انتقالی الکتروشیمیایی Cl^- و HCO_3^- را وساطت می‌کند (شکل ۵۰-۱۲). این انتقال‌دهنده را **تعویض‌کننده Cl^--HCO_3^- غیروابسته به Na^+** یا **پروتئین تعویض آینون**، و در گلبول‌های قرمز باند ۳، می‌نامند؛ نامگذاری اخیر به دلیل موقعیت پروتئین‌های غشاء گلبول قرمز در الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل آمید حاوی SDS می‌باشد. جهت جریان یون بستگی به شیب‌های غلظتی یون‌ها در عرض غشاء دارد. این انتقال‌دهنده در تنظیم غلظت HCO_3^- گلبول قرمز در خون شریانی و وریدی مهم است. انتقال‌دهنده کلیوی شکل کوتاه‌شده پروتئین موجود در گلبول قرمز است و مسئول خروج باز (HCO_3^-) برای متعادل‌سازی خروج H^+ به‌واسطه ATP می‌باشد.



شکل ۵۰-۱۲ مکانیسم انتقالی‌ناهمسوی آنیونی برای جابه‌جایی Cl^- و HCO_3^- در عرض غشاء پلاسمایی گلبول قرمز.

تعویض‌کننده Na^+/H^+ میزان pH سیتوپلاسمی را تنظیم می‌کند

۹ ایزوفرم **تعویض‌کننده Na^+/H^+** پستانداران از اعضاء یک خانواده بزرگ پروتئین‌ها در باکتری‌ها، آرکی‌ها، مخمر، و حیوانات می‌باشند. اندازه آنها از ۵۴۱ تا ۸۹۴ ریشه متفاوت است و ۱۰ تا ۱۲ قطعه مارپیچی α عرض‌غشایی پیش‌بینی‌شده دارند. یکی از فعالیت‌های اصلی فیزیولوژیک، خارج‌سازی H^+ تولیدی در طی متابولیسم می‌باشد، لذا سبب تنظیم

pH سیتوزولی شده و مانع اسیدی‌شدن داخل سلول می‌گردد. در کلیه، ایزوفرم ۳ در جهت بازجذب Na^+ از مجرای نفرون عمل می‌کند. ایزوفرم ۱ در عضله قلب توسط pH پایین و به‌واسطه فسفریلاسیون فعال می‌شود. این ایزوفرم ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز یک انفارکتوس میوکارد و هیپرتروفی بافتی داشته باشد.

میتوکندری‌ها تعدادی انتقال‌دهنده دارند که به‌واسطه پتانسیل الکتروشیمیایی عمل می‌کنند

غشاء داخلی میتوکندری انتقال‌دهنده‌هایی برای تعویض آنیون‌ها بین سیتوپلاسم و ماتریکس میتوکندری دارند که عبارتند از (۱) یک هم‌انتقال‌دهنده ناهمسوی ADP و ATP، (۲) یک هم‌انتقال‌دهنده همسوی فسفات و H^+، (۳) یک انتقال‌دهنده دی‌کربوکسیلات، و (۴) یک هم‌انتقال‌دهنده ناهمسوی گلوتامات–آسپارتات (برای جزئیات بیشتر ص ۷۸۳ را ببینید). این انتقال‌دهنده‌ها در حفظ انرژی و متابولیم مهم هستند. در غیاب دهنده انرژی، این انتقال‌دهنده‌ها می‌توانند یک نوع تبادل غیرفعال متابولیت‌ها را در جهت شیب غلظتی آنها تا رسیدن به یک تعادل ترمودینامیکی وساطت کنند. در برخی موارد، انتقال‌دهنده حرکت انتقالی ناهمسو تعداد برابر بار الکتریکی موجود بر روی سوبستراها را وساطت می‌کنند که پتانسیل غشاء میتوکندریایی بر روی این تعادل تأثیر می‌گذارد.

۱۲-۱۰ • انتقال‌دهنده‌های فعال اولیه

انتقال‌دهنده‌های فعال اولیه موجود در سلول‌های پستانداران شامل سیستم‌های انتقالی هستند که در آنها

۱. برای حرکت سوبسترا در برابر شیب شیمیایی یا الکتروشیمیایی از انرژی آزاد هیدرولیز یک پیوند پیروفسفات (ص ۷۳۳) استفاده می‌شود؛ و

۲. پروتئین انتقالی ممکن است طی فرایند انتقال به‌طور موقتی فسفریله شود، ولی سوبسترا فسفریله یا تغییر داده نمی‌شود.

این خانواده از انتقال‌دهنده‌ها جابه‌جایی یک ماده در برابر شیب غلظتی آن را کاتالیز نموده و منجر به خلق یک شیب شیمیایی یا الکتروشیمیایی می‌گردد. همانند تمامی انتقال-دهنده‌ها، اینها بر اساس کینتیک اشباع، ویژگی برای یک یا تعداد کمی سوبسترای مرتبط، و قابلیت مهار، مشخص می‌گردند. این انتقال‌دهنده‌ها در تمامی موجودات زنده یافت می‌شوند. سلول‌های پستانداران از ATP یا نوکلئوزید تری‌فسفات دیگری به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند. انتقال‌دهنده‌هایی که از ATP استفاده می‌کنند، **ATPase** نیز نامیده می‌شوند که اشاره به فعالیت آنزیمی آنها در هیدرولیز ATP طی جابه‌جایی دارد. در موجودات دیگر از دکربوکسیلاسیون، انتقال متیل، اکسیداسیون–احیاء و جذب نور برای انجام انتقال استفاده می‌شود.

سه خانواده از انتقال‌دهنده‌های فعال اولیه جابه‌جایی کاتیون‌های معدنی (Na^+، K^+، Ca^{2+}، یا H^+) راکاتالیز می‌کنند و به‌عنوان انتقال‌دهنده‌های نوع P، V یا F طبقه‌بندی می‌شوند. **انتقال‌دهنده‌های نوع P** طی فرایند انتقال فسفریله و دفسفریله می‌شوند؛ بیش از ۳۰۰ عضو در این زیرخانواده وجود دارد. **انتقال‌دهنده‌های نوع V** (V برای وزیکولی) پمپ‌های پروتونی مسئول اسیدی‌نمودن داخل لیزوزوم‌ها، آندوزوم‌ها، وزیکول‌های گلژی و وزیکول‌های ترشحی هستند. **انتقال‌دهنده‌های نوع F** در میتوکندری‌ها، کلروپلاست‌ها و باکتری‌ها وجود دارند، پروتون‌ها را به قیمت هیدرولیز ATP انتقال می‌دهند، ولی وقتی در جهت عکس فعالیت دارند، یعنی در زمانی که پروتون‌ها در جهت شیب غلظتی خود انتقال داده می‌شوند، ATP را سنتز می‌کنند (ص ۷۷۴).

انتقال‌دهنده‌های حاوی کاست اتصال به ATP[1] (ABC) یک فوق‌خانواده بسیار بزرگ و بی‌همتا از انتقال‌دهنده‌های فعال اولیه وابسته به ATP هستند که برای انتقال انواع مختلفی از ملکول‌های معدنی و آلی مورد نیاز می‌باشند.

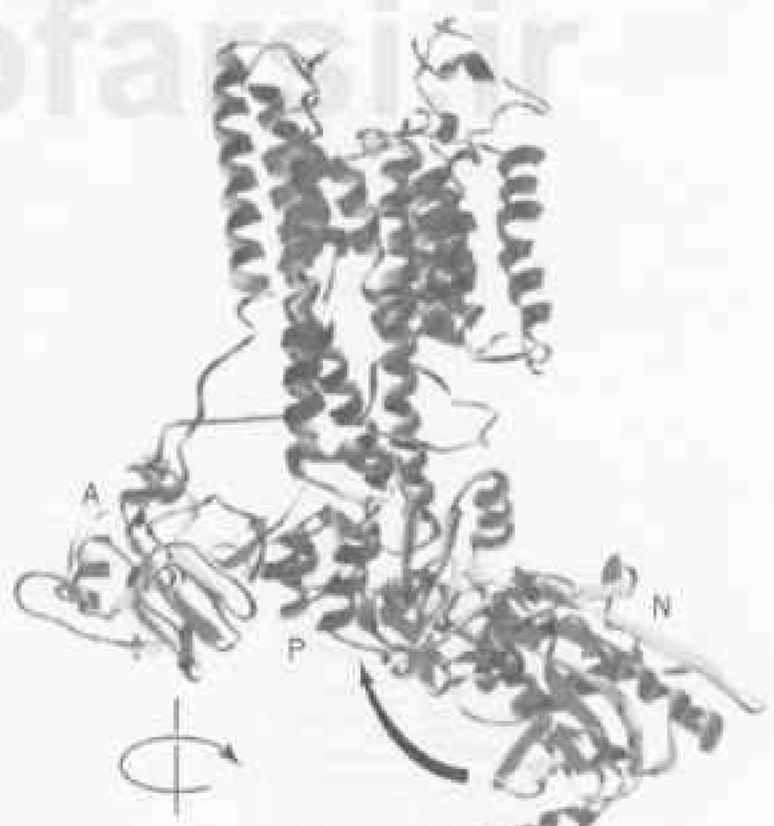
انتقال‌دهنده‌های فعال اولیه نمونه

جابه‌جایی هم‌انتقالی ناهمسوی Na^+ و K^+ از طریق انتقال فعال اولیه می‌باشد

غشاء خارجی یا پلاسمایی سلول‌های مربوط به تمامی اشکال حیات، حاوی هم انتقال‌دهنده ناهمسوی Na^+/K^+ نوع P هستند که انرژی حاصل از هیدرولیز ATP به ADP و فسفات را برای انجام جابه‌جایی مورد استفاده قرار می‌دهند. این انتقال‌دهنده را **ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+** می‌نامند، ولی اغلب **Na^+/K^+-ATPase** یا **پمپ Na^+** نامیده می‌شود. این فوق‌خانواده از پروتئین‌های چندزیرواحدی که در باکتری‌ها، آرکی‌ها، و اوکاریوت‌ها یافت می‌شود، یک زیرواحد بزرگ دارد که هر دو فعالیت ATPase و جابه‌جایی را کاتالیز می‌کند. اعضاء این فوق‌خانواده در باکتری‌ها برای برداشت و یا انتقال به‌خارج K^+، Mg^{2+}، Ca^{2+}، Ag^+، Zn^{2+}، Co^{2+}، Pb^{2+}، Ni^{2+}، Cd^{2+}، و Cu^{2+} شرح داده شده‌اند.

غشاءهای پلاسمایی تمامی سلول‌های پستانداران واکنش زیر را کاتالیز می‌کنند

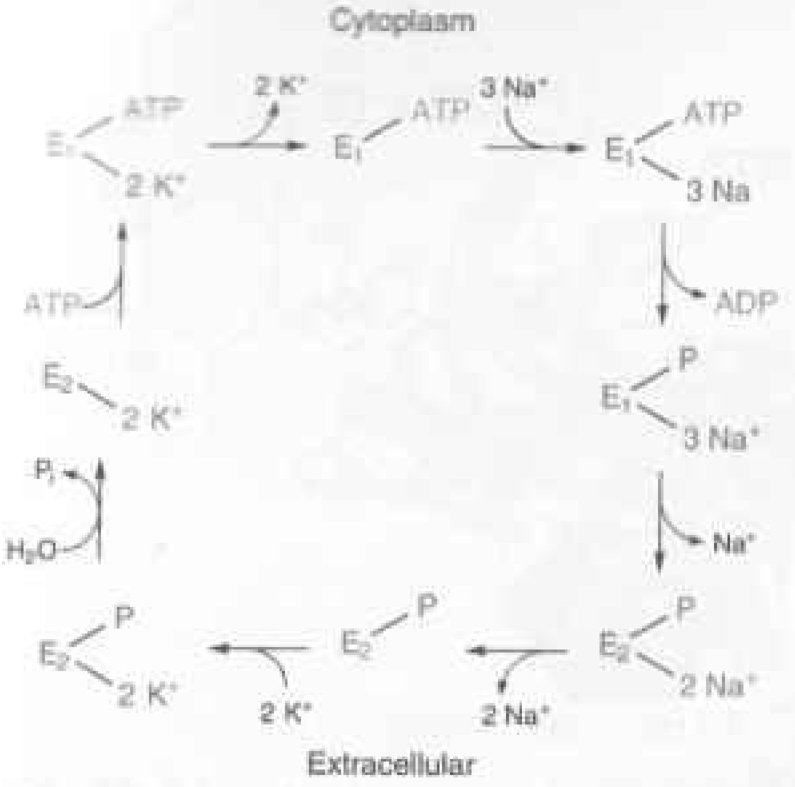
$$ATP \xrightarrow[Mg^{2+}]{Na^+ + K^+} ADP + Pi \qquad (۱۲-۴)$$



شکل ۵۱-۱۲ ساختمان زیرواحد α در ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+. مدلی از زیرواحد α در ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+. دومن‌های پیش‌بینی‌شده شامل دومن اتصال به نوکلئوتید (N) و دومن فسفریلاسیون (P) هستند. ماریپچ‌های α با سایه‌های آبی و سبز، صفحات β با سایه‌های قرمز و زرد، و فنرها با رنگ خاکستری نشان داده شده‌اند.

که نیاز مطلقی به یون‌های Na^+ و K^+ و برای Mg^{2+}، کوفاکتوری برای واکنش‌های نیازمند ATP، دارد. این انتقال‌دهنده مسئول حفظ غلظت بالای K^+ و پایین Na^+ در سیتوپلاسم سلول‌های پستانداران است (ص ۲۰). بافت‌های تحریک‌پذیر، نظیر عضله و عصب، و سلول‌هایی که به‌طور فعال در حرکت یون Na^+ نقش دارند، نظیر انواع موجود در غده بزاقی و کورتکس کلیه، فعالیت‌های بالای ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+ را دارند. برآورد شده است که این انتقال‌دهنده حدود ۶۰ تا ۷۰٪ از ATP تولیدی توسط عصب و

1. ATP-binding cassette transporters

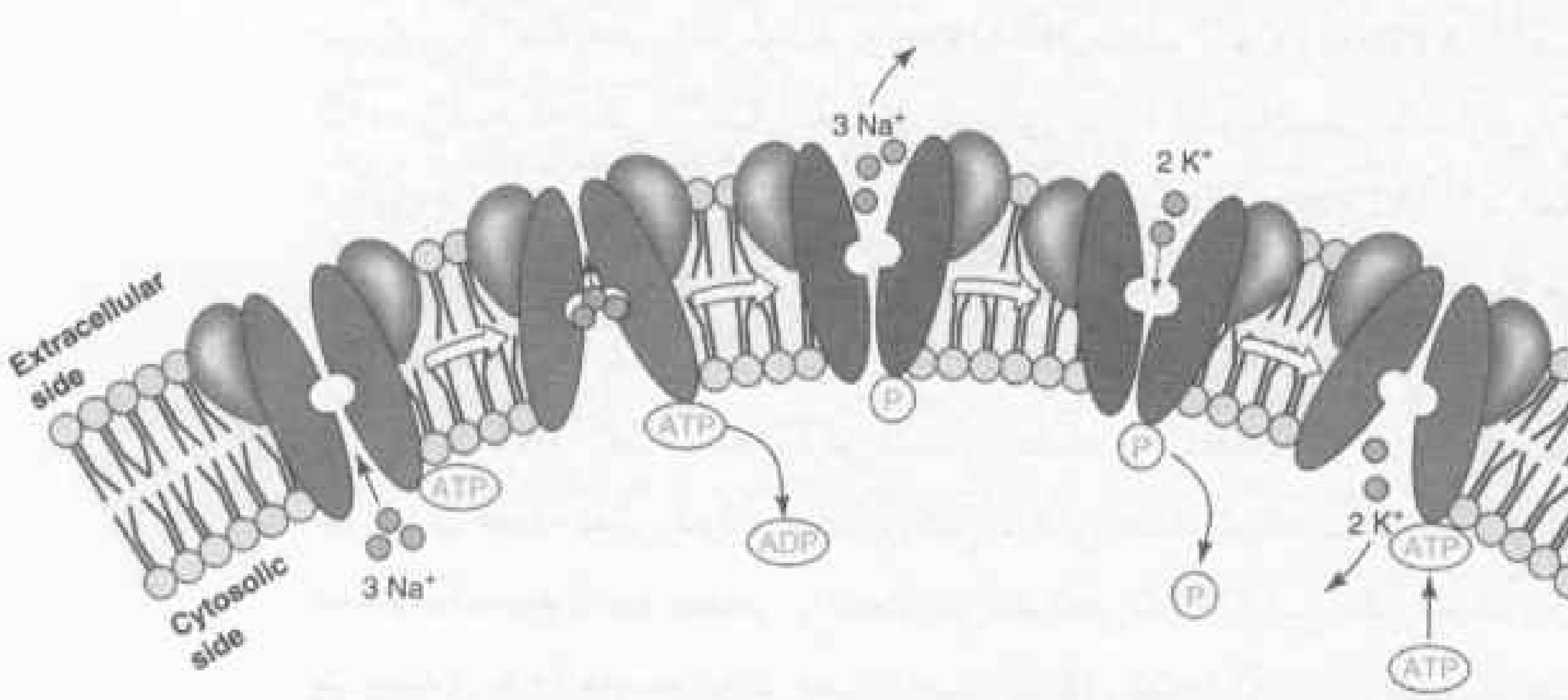


شکل ۵۲-۱۲ توالی فرضی واکنش‌ها و ترکیبات واسط هیدرولیز ATP توسط ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+. E_1 و E_2 کونفورماسیون‌های مختلف آنزیم هستند. فسفریلاسیون آنزیم نیاز به Na^+ و Mg^{2+} دارد و دفسفریلاسیون به همکاری K^+ انجام می‌شود.

سلول‌های عضلانی، و همچنین حدود ۳۵٪ از ATP تولیدی در یک فرد در حال استراحت را مصرف می‌کند.

این انتقال‌دهنده متشکل از یک زیرواحد α (۱۱۰ kDa) و یک زیرواحد β (۵۵ kDa) است؛ احتمال دارد انتقال‌دهنده واقعی، تترامری از دو زیرواحد α و دو زیرواحد β می‌باشد. زیرواحد α دارای ۱۰ قطعه مارپیچی α عرض غشایی (شکل ۵۱-۱۲)، حاوی هر دو فعالیت ATPase و جابه‌جایی، است و طی فرایند انتقال بر روی یک ریشه اسید آسپارتیک در جهت تولید یک β–آسپارتیل فسفات، فسفریله و دفسفریله می‌شود. جایگاه‌های اتصال به کاتیون و ATP بر روی دومن‌های مختلف زیرواحد β قرار دارند. زیرواحد β شدیداً گلیکوزیله است و قرارگیری زیرواحد α در غشاء بعد از سنتز را تسهیل نموده و سبب تثبیت کمپلکس می‌شود؛ این زیرواحد همچنین ممکن است به‌طور فعال در فعالیت انتقالی شرکت کند. انتقال‌دهنده کلیه حاوی یک زیرواحد γ است که ممکن است بر روی پارامترهای کینتیکی فعالیت تأثیر بگذارد. فسفریلاسیون زیرواحد α نیاز به اتصال Na^+ و Mg^{2+} و نه K^+ دارد، در حالی‌که دفسفریلاسیون نیازمند اتصال K^+ و نه Na^+ یا Mg^{2+} می‌باشد (شکل ۵۲-۱۲). این کمپلکس پروتئینی دو کونفورماسیون قابل تمایز دارد که به‌عنوان **انتقال‌دهنده نوع E1–E2** طبقه‌بندی می‌شود تا تغییر در کونفورماسیون را نشان دهد.

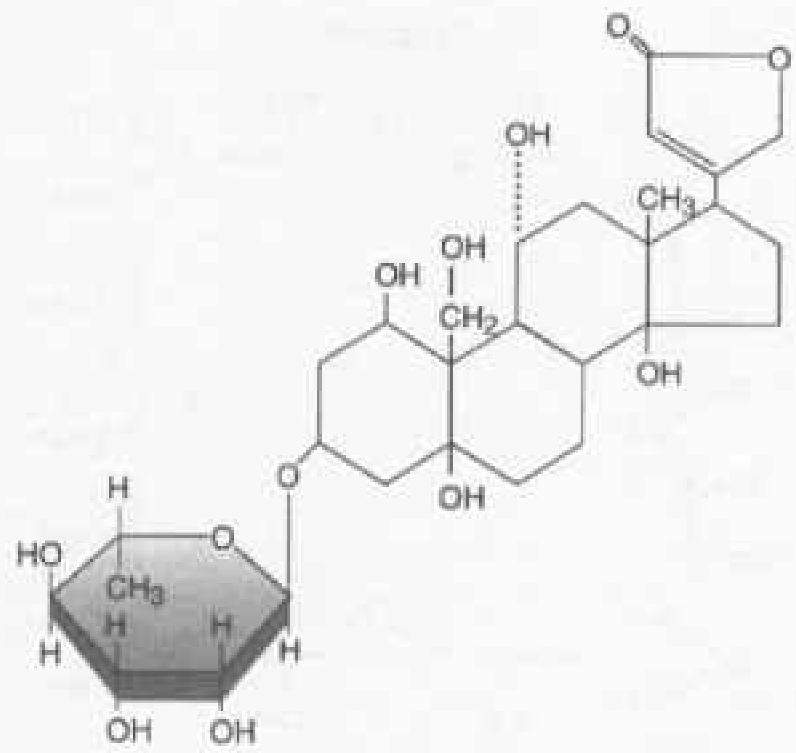
حرکت Na^+ و K^+ یک فرایند هم‌انتقالی ناهمسوی الکتروژنیک است که طی آن به ازاء هیدرولیز هر ملکول ATP، سه یون Na^+ به خارج و دو یون K^+ به داخل سلول انتقال داده می‌شود. این انتقال سبب می‌شود تا بار مثبت خارج سلولی افزایش یافته که قسمتی از مکانیسم حفظ پتانسیل عرض غشایی در سلول‌ها است. هیدرولیز ATP توسط انتقال‌دهنده تنها در زمانی رخ می‌دهد که Na^+ و K^+ جابه‌جا می‌شوند. مدلی برای حرکت Na^+ و K^+ در شکل ۵۳-۱۲ به نمایش گذاشته شده است. این پروتئین از میان تغییرات کونفور-



شکل ۵۳-۱۲ مدلی برای جابه‌جایی Na^+ و K^+ در عرض غشاء پلاسمایی توسط ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+. (۱) انتقال‌دهنده در کونفورماسیون ۱ به Na^+ اتصال می‌یابد. (۲) انتقال‌دهنده در کونفورماسیون ۲، Na^+ را جابه‌جا و آزاد می‌کند. (۳) انتقال‌دهنده در کونفورماسیون ۲ به K^+ اتصال می‌یابد. (۴) انتقال‌دهنده در کونفورماسیون ۱، K^+ را جابه‌جا و آزاد می‌کند.

ماسیونی عبور می‌کند که طی آنها Na^+ و K^+ مسافت کوتاهی را در داخل این پروتئین طی می‌کنند. این تغییر کونفورماسیونی سبب کاهش تمایل جایگاه اتصالی برای این کاتیون‌ها و در نتیجه آزادسازی کاتیون به داخل محیطی می‌شود که غلظت آن بیش از محیطی است که از آنجا کاتیون انتقال داده شده است.

ایزوفرم‌های مختلفی از این انتقال‌دهنده با مکانیسم‌های مختلفی، شامل غلظت سوبسترا، اسکلت‌سلولی، مهارکننده‌های موجود در گردش خون، و انواع مختلفی از هورمون‌ها، تنظیم می‌شوند. این فعالیت نیاز به فسفولیپیدها دارد؛ این انتقال‌دهنده جایگاه‌های اتصالی برای حدود ۳۰ ملکول دارد و مقادیر اسید دوکوزاهگزاانوئیک (اسید چرب زنجیر بلند غیراشباع با چند پیوند دوگانه) در مغز با فعالیت ATPase در ارتباط است. **استروئیدهای کاردیوتونیک**، نظیر **دیژیتالیس**، مهارکننده‌های ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+ هستند و نیروی انقباض عضلـه قلب از طریق تغییر تحریـک‌پذیری ایـن بافت را افزایش می‌دهد. **وابین**[1] (شکل ۵۴-۱۲) یکی از قویترین مهارکننده‌های ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+ است که به زیرواحد کوچکی بر روی سطح خارجی غشاء اتصال می‌یابد.



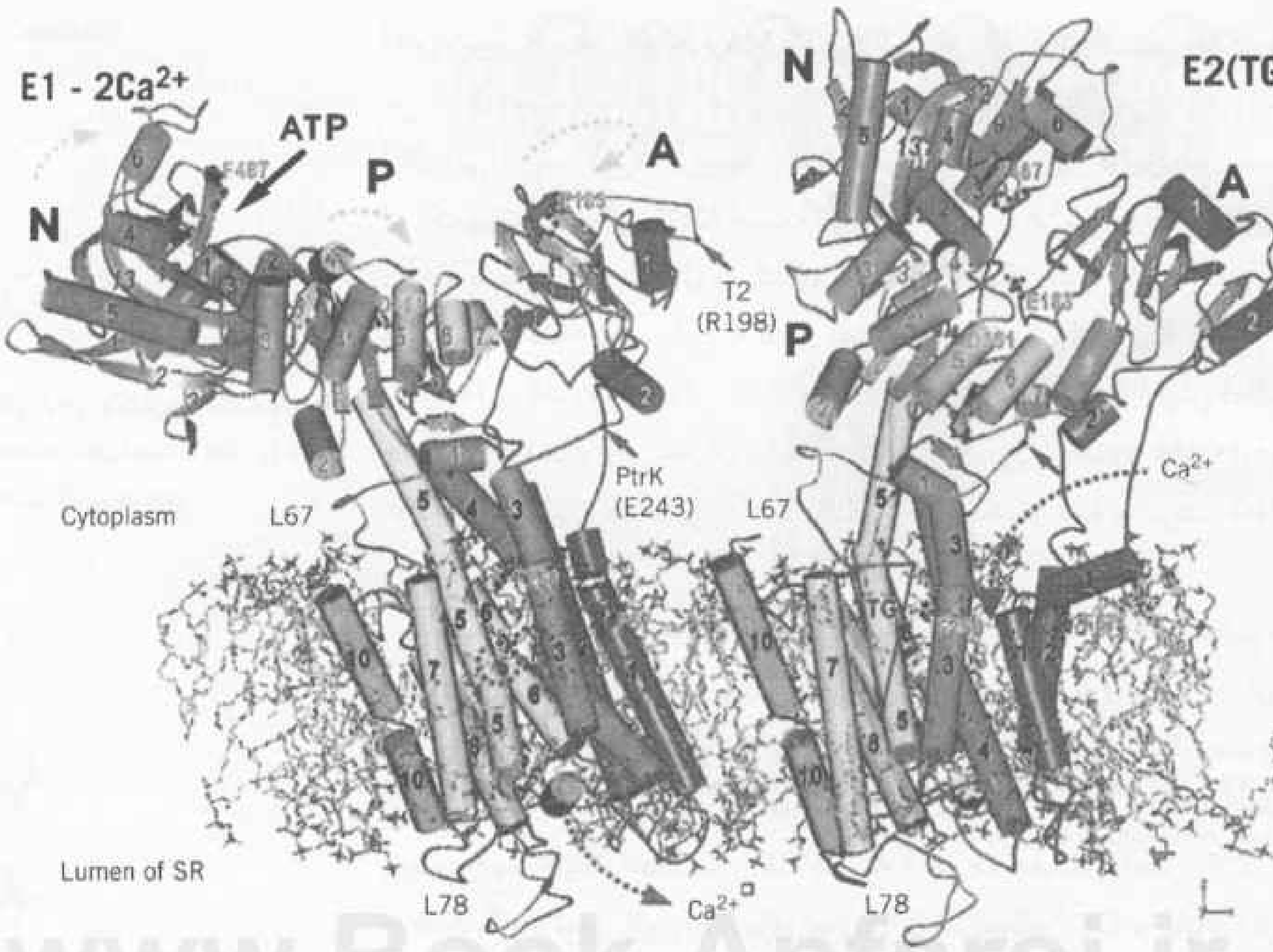
شکل ۵۴-۱۲ ساختمان وابین، یک استروئید کاردیوتونیک، به‌عنوان یک مهارکننده قوی ATPase تعویض‌کننده Na^+/K^+.

جابه‌جایی Ca^{2+} توسط یک انتقال‌دهنده فعال اولیه کاتالیز می‌شود

کلسیم پیامبر داخل‌سلولی مهمی است که بسیاری از فرایندهای سلولی را از متابولیسم کربوهیدرات‌ها تا انقباض عضلانی تنظیم می‌کند. غلظت Ca^{2+} سیتوزولی حدود ۰٫۱۰ μM می‌باشد که بیش از ۱۰,۰۰۰ برابر کمتر از غلظت Ca^{2+} خارج‌سلولی است. Ca^{2+} سیتوزولی سریعاً با آزادسازی Ca^{2+} از شبکه آندوپلاسمی یا سارکوپلاسمی یا بازشدن موقتی کانال‌های Ca^{2+} موجود در غشاء پلاسمایی که امکان برقراری جریان Ca^{2+} در جهت شیب غلظتی بزرگ آن را فراهم می‌سازد (ص ۶۵۳)، افزایش می‌یابد. برای کاهش دوباره میزان سیتوزولی، Ca^{2+} به‌طور فعال توسط دو **ATPase انتقال‌دهنده Ca^{2+} (Ca^{2+}-ATPase)** انتقال داده می‌شود که یکی Ca^{2+} را به داخل مجرای شبکه آندوپلاسمی یا سارکوپلاسمی و دیگری در عرض غشاء پلاسمایی به خارج سلول برمی‌گرداند. Ca^{2+}-ATPase ها انتقال‌دهنده‌های نوع P هستند که توسط ATP بر روی یک ریشه آسپارتیل فسفریله می‌شوند؛ این انتقال‌دهنده‌ها با دو کونفورماسیون وجود دارند، لذا انتقال‌دهنده‌های نوع E1-E2 هستند.

Ca^{2+}-ATPase شبکه سارکوپلاسمی عضله (SERCA) در چرخه‌های انقباض-شل‌شدن عضله نقش دارد و ۸۰٪ پروتئین داخلی غشاء شبکه سارکوپلاسمی را شامل شده و یک سوم ناحیه سطحی را اشغال می‌کند (ص ۱۲۹۵). این انتقال‌دهنده یک زنجیر پلی‌پپتیدی با ۱۰ مارپیچ ترانس‌ممبران است (شکل ۵۵-۱۲). به ازاء هیدرولیز هر ملکول ATP، دو یون Ca^{2+} از سیتوزول به داخل مجرا و در برابر یک شیب غلظتی بزرگ (10^4)، در تبادل هم‌انتقالی ناهمسو با $2H^+$، انتقال داده می‌شود. در حالت E1 (شکل ۵۶-۱۲)،

1. Ouabain



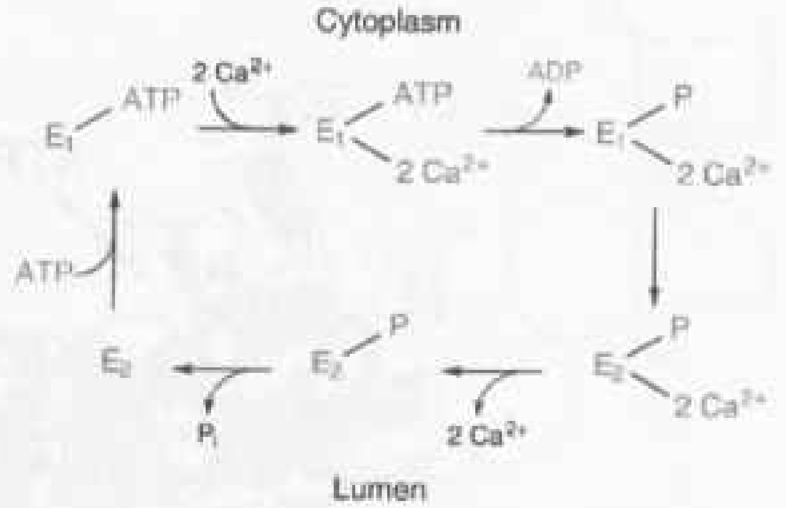
شکل ۵۵-۱۲ ساختمان ATPase انتقال‌دهنده Ca^{2+}. تغییرات کونفورماسیونی ATPase انتقال‌دهنده Ca^{2+} شبکه سارکوپلاسمی. نقاط ورود و خروج Ca^{2+} با پیکان ارغوانی نشان داده شده‌اند. شکل سمت چپ از نوع متصل به Ca^{2+} و در سمت راست بدون Ca^{2+} است.

جایگاه‌های اتصالی تمایل بالایی برای Ca^{2+} دارند و در سیتوزول در دسترس می‌باشند، در حالی‌که در وضعیت E2 جایگاه‌های اتصال به Ca^{2+} تمایل پایینی دارند و به‌سمت مجرا باز می‌باشند. شکل فاقد Ca^{2+} تفاوت‌های کونفورماسیونی زیادی را نسبت به شکل متصل به Ca^{2+} نشان می‌دهد (شکل ۵۶-۱۲). دو یون Ca^{2+} پهلو به پهلو اتصال یافته و توسط چهار مارپیچ عرض غشایی احاطه می‌شوند. تصور می‌رود که احتمالاً Ca^{2+}-ATPase شبکه سارکوپلاسمی با اتصال Ca^{2+} و به دنبال آن هیدرولیز ATP، ولی با آزادسازی دوباره Ca^{2+} به داخل سیتوزول و بدون جابه‌جایی کاتیون، در **حرارت‌زایی** نیز نقش داشته باشد. انرژی هیدرولیز ATP به صورت حرارت آزاد می‌شود. پپتید کوچکی، به‌نام **سارکولیپین**[1]، تولید حرارت را افزایش می‌دهد.

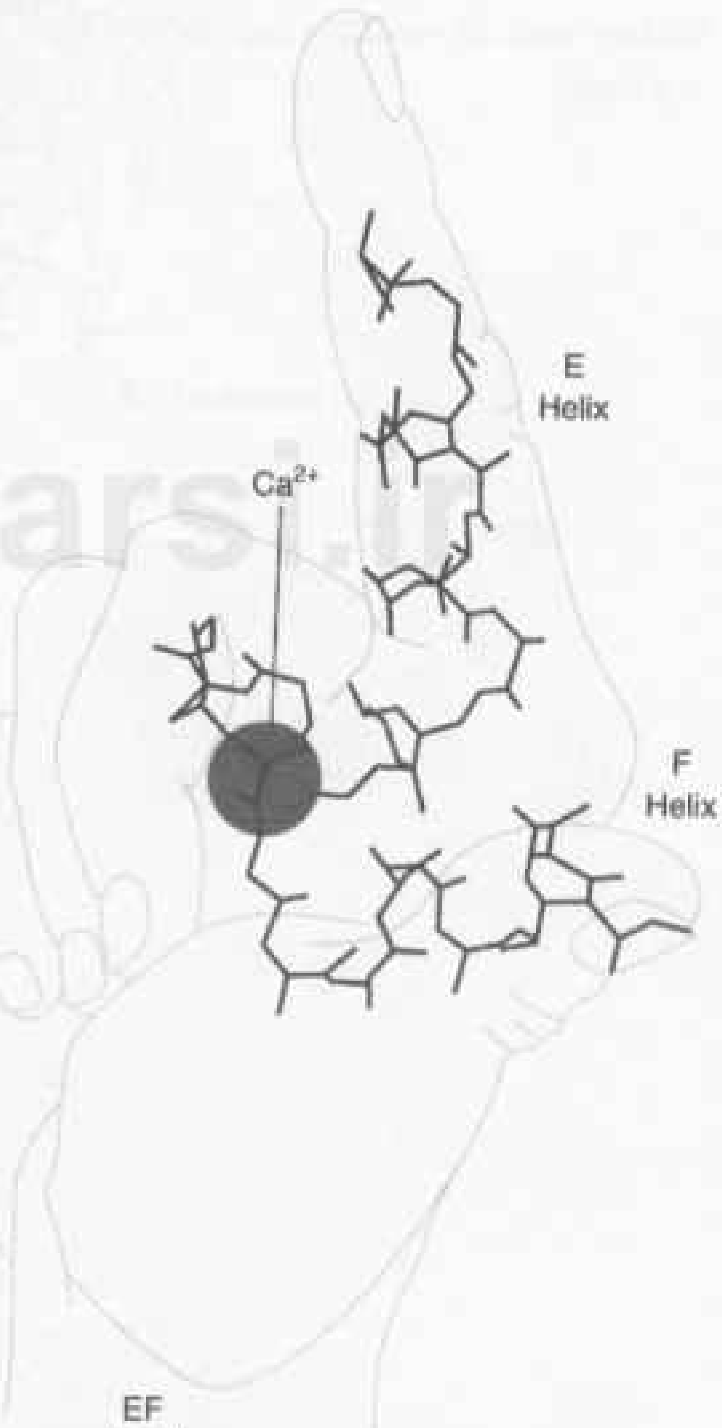
کالمودولین در کنترل ATPase انتقال‌دهنده Ca^{2+} موجود در غشاءهای پلاسمایی نقش دارد

ATPase انتقال‌دهنده Ca^{2+} غشاء پلاسمایی (PMCA) مشابه نوع موجود در شبکه

1. Sarcolipin



شکل ۵۶-۱۲ **توالی فرضی واکنش‌ها و ترکیبات واسط در جابه‌جایی توسط ATPase انتقال‌دهنده Ca^{2+}. E_1 و E_2 کونفورماسیون‌های مختلف آنزیم هستند.**



شکل ۵۷-۱۲ **جایگاه اتصالی برای Ca^{2+} در کالمودولین.** کالمودولین چهار جایگاه اتصالی Ca^{2+} دارد که هر کدام حاوی یک موتیف مارپیچ-قوس-مارپیچ است. یون Ca^{2+} در داخل قوسی اتصال یافته است که دو مارپیچ را به هم وصل می‌کند. این موتیف در پروتئین‌های مختلف اتصال به کلسیم وجود دارد و دست EF نامیده می‌شود.

آندوپلاسمی است. ۳۰ ایزوفرم **PCMA** مورد شناسایی قرار گرفته است. برخلاف **SERCA**، این انتقال‌دهنده تنها یک Ca^{2+} را به ازاء هیدرولیز **ATP** انتقال می‌دهد. در سلول‌های اوکاریوتی، این انتقال‌دهنده توسط Ca^{2+} سیتوپلاسمی از طریق **کالمودولین** تنظیم می‌شود که یک پروتئین اتصالی Ca^{2+} است (شکل ۵۷-۱۲). با افزایش میزان Ca^{2+} سیتوزولی، Ca^{2+} به کالمودولین اتصال می‌یابد که یک ثابت تفکیک حدود $1\mu M$ برای Ca^{2+} دارد. کمپلکس Ca^{2+}–کالمودولین به انتقال‌دهنده Ca^{2+} اتصال‌یافته، K_m را برای Ca^{2+} از حدود ۲۰ به $0{,}5\mu M$ کاهش داده و انتقال Ca^{2+} را زیاد می‌کند. افزایش فعالیت سبب کاهش Ca^{2+} سیتوزولی به میزان در حال استراحت طبیعی آن (حدود $0{,}1\mu M$) می‌شود که در این غلظت، کمپلکس Ca^{2+}– کالمودولین تفکیک شده و سرعت انتقال Ca^{2+} به میزان پایه برمی‌گردد.

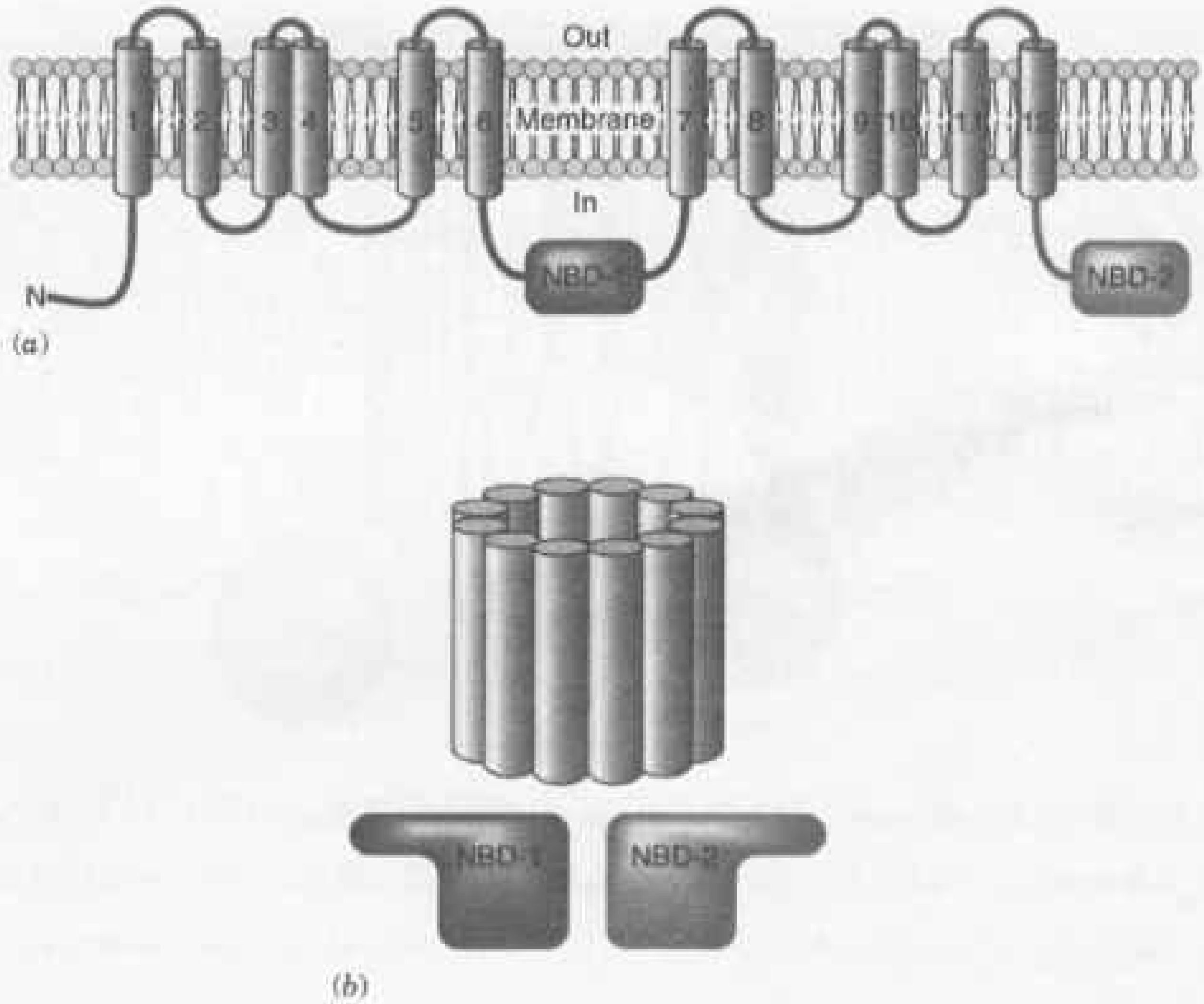
فرایندهای سلولی دیگر نیز توسط کمپلکس Ca^{2+}–کالمودولین تنظیم می‌شوند. کالمودولین یکی از چندین پروتئین اتصالی Ca^{2+}، شامل **پاروالبومین**[1] و **تروپونین C**[2] است که ساختمان‌های بسیار مشابهی دارند. کالمودولین (۱۷ kDa) شکل یک دمبل با دو انتهای کروی را دارد که توسط یک مارپیچ α هفت پیچی به یکدیگر متصل شده‌اند؛ این پروتئین چهار جایگاه اتصال به Ca^{2+} دارد که شامل دو جایگاه با تمایل بالا در یک انتها و دو جایگاه با تمایل پایین در انتهای دیگر می‌باشد. اتصال Ca^{2+} به جایگاه‌های با تمایل پایین‌تر سبب ایجاد یک تغییر کونفورماسیونی می‌شود که یک ناحیه آبگریز را آشکار می‌سازد که با پروتئین تحت کنترل خود تعامل می‌کند. هر جایگاه اتصال به Ca^{2+} متشکل از یک ساختمان دوم مارپیچ-قوس-مارپیچ (شکل ۵۷-۱۲) است که Ca^{2+} در قوس متصل‌کننده مارپیچ‌ها اتصال می‌یابد. این موتیف را براساس مطالعات انجام‌شده بر روی پاروالبومین که در آن Ca^{2+} بین مارپیچ‌های E و F پروتئین متصل می‌شود، دست EF[3] گویند.

برخی خصوصیات این دو خانواده انتقال‌دهنده‌های Ca^{2+} مشترک می‌باشد؛ برای مثال، تمایل بالا برای Ca^{2+}، توپوگرافی غشایی، و سازماندهی دومن کاتالیتیک. گرچه این دو خانواده از نظر خصوصیات ساختمانی و عملکردی، به‌خصوص از نظر تنظیمی، با یکدیگر اختلاف دارند.

انتقال‌دهنده‌های کاست اتصال به ATP (ABC)

غشاءهای مربوط به پروکاریوت‌ها و اوکاریوت‌ها انتقال‌دهنده‌هایی دارند که متعلق به فوق خانواده **انتقال‌دهنده‌های حاوی کاست اتصال به ATP (ABC)** هستند که یک حرکت عمودی وابسته به ATP مواد مختلف را کاتالیز می‌کنند. ده‌ها زیرخانواده در این فوق‌خانواده و بیش از ۱۰۰۰ ژن، اکثراً از باکتری‌ها، برای انتقال‌دهنده‌های ABC کلون شده است؛ ژنوم انسانی حداقل ۴۹ ژن دارد. انتقال‌دهنده‌های ABC در غشاء پلاسمایی و همچنین در غشاءهای

1. Parvalbumin 2. Troponin C 3. EF hand

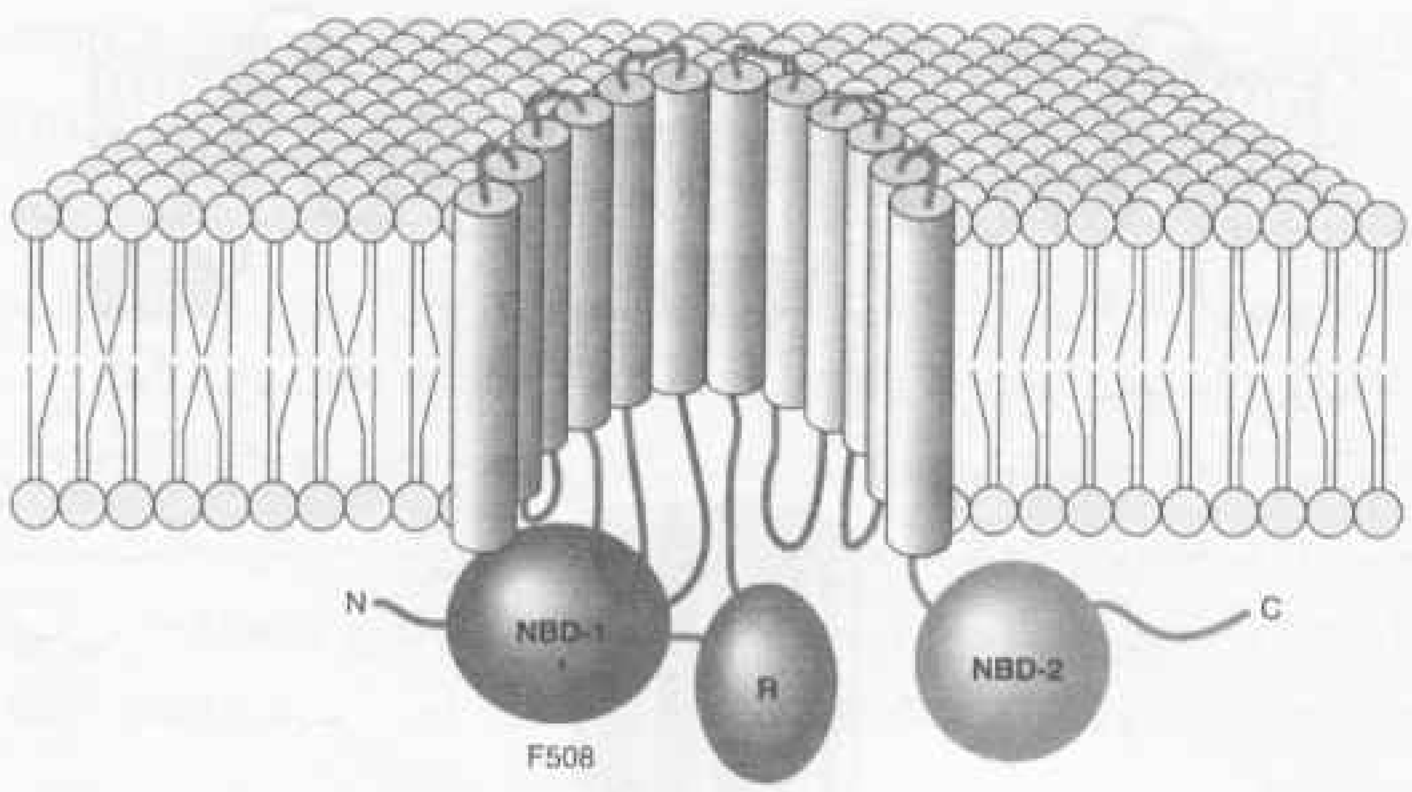


شکل ۵۸-۱۲ مدل یک گلیکوپروتئین P، یک انتقال‌دهنده حاوی کاست اتصال به ATP (ABC). NBD-1 و NBD-2 دومن‌های اتصال به نوکلئوتید هستند.

داخل‌سلولی مربوط به سلول‌های پستانداران وجود دارند که جریان رو به داخل یا خارج لیپیدهای مختلف (فسفولیپیدها، آسیل کوآ چرب زنجیر بلند، املاح صفراوی و کلسترول)، پپتیدها، انواع مختلفی از ملکول‌های آلی سمی و عوامل شیمی‌درمانی را کاتالیز می‌کنند. انتقال‌دهنده‌های ABC موجود در باکتری‌ها بسیار فراگیر هستند، یون‌ها، فلزات سنگین، قندها، داروها، اسیدهای آمینه، پپتیدها و پروتئین‌ها را انتقال می‌دهند. این انتقال‌دهنده‌ها یک ساختمان قطعه‌ای با یک دومن حاوی شش بخش عرض‌غشایی، و یک دومن (یاکاست) اتصال به ATP سیتوزولی دارند. دومن‌های اتصال به ATP موجود در این فوق خانواده هُمولوژی توالی وسیع مشترک را دارند. اکثر زیرخانواده‌ها یک تکرار پشت‌سرهم از دو دومن عرض‌غشایی و دو دومن اتصال به ATP دارند (شکل ۵۸-۱۲). از نظر مکانیسم، انتقال دهنده‌های مجزای ABC یا به‌عنوان کانال و یا به‌عنوان انتقال‌دهنده فعالیت می‌کنند. اتصال ATP سبب القاء یک تغییر کونفورماسیونی در دومن‌های عرض‌غشایی می‌شود، ولی هیدرولیز ATP همراه با فسفریلاسیون انتقال‌دهنده نیست. مکانیسم جفت‌شدن انرژی هیدرولیز ATP با حرکت سوبسترا، هنوز مشخص نشده است.

در انسان، یکی از زیرخانواده‌های مربوط به انتقال‌دهنده‌های ABC توسط **خانواده مقاومت چنددارویی**[1] **(Mdr)** ژن‌ها کد می‌شود. این محصولات ژنی، گلیکوپروتئین‌هایی تحت عنوان **P-گلیکوپروتئین‌ها** هستند که برخی از آنها مسئول خارج‌سازی انواع مختلفی از گزنوبیوتیک‌ها از سلول‌ها می‌باشند. بیان بیش از حد ژن‌های **Mdr** توسط سلول‌های توموری

1. Multidrug resistance



شکل ۵۹-۱۲ دیاگرام شماتیک تنظیم‌کننده هدایت عرض‌غشایی فیبروزکیستیک (CFTR)، یک عضو خانواده انتقال‌دهنده ABC. NBD-1 و NBD-2 زیرواحدهای اتصال به ATP و R یک زیرواحد تنظیمی است. F508 محل حذف فنیل‌آلانین است که در حدود ۷۰٪ مبتلایان به فیبروز کیستیک رخ می‌دهد.

منجر به افزایش مقاومت به انواع مختلفی از داروها می‌شود، زیرا عوامل شیمی‌درمانی با افزایش تعداد انتقال‌دهنده‌ها، سریعاً به خارج سلول منتقل می‌گردند. لذا دارو به غلظت‌های دارویی مؤثر نمی‌رسند. **پروتئین‌های مرتبط** با **مقاومت چنددارویی**[1] **(MRP)** دیگر مسئول خروج ترکیبات کونژوگه‌شده با گلوتاتیون، گلوکورونات، و سولفات، از سلول‌ها هستند. انتقال‌دهنده‌های P-گلیکوپروتئین مسئول خروج لیپیدهایی نظیر فسفاتیدیل‌کولین، کلسترول و اسیدهای صفراوی از عرض غشاء کانالیکولی سلول‌های کبدی هستند. یکی از این اعضاء نقش فیزیولوژیکی مهمی در انتقال گلوکورونیدهای بیلی‌روبین از کبد به داخل صفرا دارد (ص ۱۰۷۲). انتقال‌دهنده ABC دیگر، **گیرنده سولفونیل‌اوره** متصل به یک کانال K^+ است که در تنظیم ترشح انسولین به‌واسطه گلوکز نقش دارد.

تنظیم‌کننده هدایت عرض‌غشایی فیبروزکیستیک[2] (CFTR) یک انتقال‌دهنده ABC است، ولی از نظر مکانیسم هم یک تنظیم‌کننده هدایت و هم یک کانال Cl^- است. این کانال حرکت ترانس‌اپی‌تلیال نمک و مایع را در غشاء پلاسمایی سلول‌های اپی‌تلیال وساطت می‌کند. CFTR متشکل از پنج دومن است که شامل دو دومن هر کدام با شش مارپیچ عرض غشایی، دو دومن اتصال به ATP و یک دومن کروی تنظیمی می‌باشد (شکل ۵۹-۱۲). فسفریلاسیون دومن تنظیمی سبب تنظیم فعالیت کانال می‌شود، در حالی‌که هیدرولیز ATP دریچه کانال را کنترل می‌کند. اختلال در عملکرد CFTR منجر به بیماری ژنتیکی فیبروز کیستیک می‌شود. حذف ریشه فنیل‌آلانین F508 در قوس NBD-1 (دومن اتصال به نوکلئوتید ۱[3]) اتصال به ATP، در حدود ۷۰٪ موارد فیبروز کیستیک وجود دارد. این حذف مانع از تاشدن مناسب NBD-1 می‌شود (ارتباط بالینی ۵-۱۲ و ارتباط بالینی ۷-۶).

1. Multidrug resistance associated proteins
2. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
3. Nucleotde- binding domain-1

ارتباط بالینی ۵-۱۲

فیبروز کیستیک و کانال Cl^-

فیبروزکیستیک (CF) یک بیماری اتوزومال مغلوب می‌باشد و شایع‌ترین بیماری جدی ارثی قفقازی‌ها است که با فراوانی ۱ در ۲۰۰۰ تولدهای زنده دیده می‌شود. این بیماری چندین عضو را درگیر می‌کند که در میان آنها، انسداد ریوی به‌عنوان یکی از تظاهرات اصلی است؛ ترشحات موکوسی راه‌های هوایی کوچک را مسدود نموده و سبب عفونت‌های باکتریایی مکرر می‌شود. اختلال در عملکرد اگزوکرین در ابتدای بیماری رخ داده که منجر به استئاتوره (مدفوع چرب) می‌شود؛ صفحه ۱۳۹۶ را برای بحث پیرامون نقش پانکراس در هضم و جذب چربی ببینید. مبتلایان به CF کاهش نفوذپذیری به Cl^- را دارند که سبب اختلال در ترشح مایع الکترولیت‌ها می‌شود که نتیجه آن دهیدراتاسیون مجرایی است. تشخیص CF با مشاهده افزایش قابل توجه در محتوای Cl^- عرق مبتلایان در مقایسه با افراد طبیعی، مورد تأیید قرار می‌گیرد.

ژن مسئول CF در سال ۱۹۸۹ مورد شناسایی قرار گرفت و بیش از ۸۰۰ جهش منتهی به CF مورد شناسایی قرار گرفته است. معمول‌ترین جهش در حدود ۷۰٪ مبتلایان مشاهده می‌گردد که شامل تنها حذف فنیل‌آلانین موقعیت ۵۰۸ این پروتئین می‌باشد، ولی جهش‌های بدمعنی، بی‌معنی، تغییر قالب و جایگاه- اسپلایس (ص. ۲۷۵) گزارش شده‌اند. بسیاری از جهش‌ها منجر به تغییر در تاشدن پروتئین می‌شوند. محصول ژن CF تنظیم‌کننده هدایت عرض‌غشایی فیبروزکیستیک (CFTR) می‌باشد. CFTR یک کانال کلری وابسته به cAMP است که ممکن است سایر کانال‌های یونی را تنظیم کند؛ این کانال در بافت‌های اپی‌تلیالی بیان می‌شود. فسفریلاسیون یک دومن تنظیمی سیتوپلاسمی توسط پروتئین کیناز A، کانال را فعال می‌کند. CFTR پلی‌پپتیدی با ۱۴۸۰ اسید آمینه است که هُمولوژی ساختمانی با فوق‌خانواده انتقال‌دهنده‌های حاوی کاست اتصال به ATP (ABC) دارد. ژن مربوطه کلون شده است و تلاش اساسی برای درمان این بیماری به‌طریق ژن درمانی، با استفاده از ناقلین ویروسی و غیرویروسی نظیر لیپوزوم‌ها، در حال انجام می‌باشد.

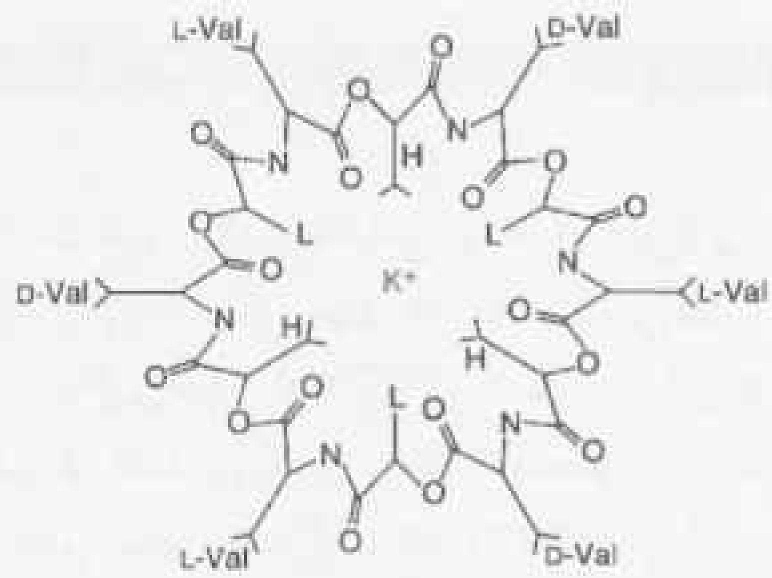
سایر بیماری‌های ژنتیکی مرتبط با نقص در پروتئین‌های اختصاصی انتقال‌دهنده ABC شامل آدرنولکودیستروفی، دیستروفی ماکولار استارگاردت[1]، یک بیماری دژنراتیو ارثی لکه زرد که منجر به ازدست‌رفتن سریع حدت بینایی، و سندروم دوبین- جانسون[2] (ارتباط بالینی ۶-۱۲) می‌باشند.

۱۱-۱۲ • سموم و یونوفورهای ایجادکننده منفذ

باکتری‌ها و چند بافت پستانداران **سموم ایجادکننده- منفذ** را سنتز می‌کنند. اینها متعلق به‌خانواده بزرگی (۵۸ عضو) از پپتیدها و پروتئین‌ها هستند که بر روی ریبوزوم‌ها سنتز می‌شوند. اینها از سلول‌ها ترشح شده و در غشاء سلول دیگر تولید منافذ عرض‌غشایی می‌کنند. منافذ ایجادشده امکان برقراری جریان الکترولیت‌ها و ملکول‌های کوچک در میان غشاء را فراهم می‌سازند و بنابراین یک اثر سمی را آغاز می‌کنند. **دِفنسین**[3] به‌عنوان یک سم تولیدکننده منفذ که توسط سلول‌های اپی‌تلیال و هماتوپویتیک سنتز می‌شود، فعالیت آنتی‌بیوتیکی وسیعی دارد.

یک گروه جالب از ترکیبات دارای وزن ملکولی کوچک (تا چندصد دالتون)، توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها سنتز و ترشح شده و سبب تسهیل در جابه‌جایی یون‌های معدنی در

1. Stargardt macular dystrophy
2. Dubin-Johonson syndrome
3. Defensin



شکل ۶۰-۱۲ ساختمان کمپلکس والینومایسین-K^+. مخفف‌ها: D-Val، D- والین؛ L-Val، L- والین؛ L، L- لاکتات؛ و H، D-هیدروکسی‌والرات.

جدول ۱۳-۱۲ • یونوفورهای اصلی

فعالیت	کاتیون‌های اصلی که منتقل می‌شوند	ترکیب
Valinomycin	K^+ or Rb^+	Uniport, electrogenic
Nonactin	NH_4^+, K^+	Uniport, electrogenic
A23187	$Ca^{2+}/2H^+$	Antiport, electroneutral
Nigericin	K^+/H^+	Antiport, electroneutral
Monensin	Na^+/H^+	Antiport, electroneutral
Gramicidin	H^+, Na^+K^+, Rb^+	تولید کانال می‌کنند
Alamethicin	K^+, Rb^+	تولید کانال می‌کنند

عرض غشاءها می‌شود. این ملکول‌ها که **یونوفور**[1] نامیده می‌شوند، فعالیت ضدباکتریایی دارند، زیرا تعادل یونی سلول را مختل می‌کنند. این ملکول‌ها همچنین ابزارهای تحقیقاتی با ارزشی در مطالعه جابه‌جایی یون‌ها در غشاءهای بیولوژیکی و برای دستکاری ترکیب یونی سلول‌ها هستند. یونوفورها جزء کانال‌هایی طبقه‌بندی می‌شوند که سنتز آنها بر روی ریبوزوم‌ها صورت نمی‌پذیرد (ص ۶۴۷)؛ دو زیرگروه اصلی وجود دارد: انتقال‌دهنده‌های متحرک که به یک یون اتصال یافته و به راحتی در یک غشاء انتشار می‌یابند و ایجادکننده‌های کانال . برخی یونوفورهای اصلی در جدول ۱۳-۱۲ فهرست شده‌اند.

هر انتقال‌دهنده متحرک یک ویژگی یونی دارد. تمایل **والینومایسین** (شکل ۶۰-۱۲) برای K^+ ۱۰۰۰ برابر بیشتر از Na^+ است، و تمایل **A23187** (شکل ۶۱-۱۲) برای Ca^{2+} ۱۰ برابر بیشتر از Mg^{2+} است. چندین مورد از انتقال‌دهنده‌های متحرک، ساختمان حلقوی دارند و یون مورد نظر با اتم‌های اکسیژن موجود در هسته این ساختمان کوئوردینانت می‌شود؛ محیط این ملکول حاوی گروه‌های آبگریز است. وقتی یک یون توسط یونوفور شلاته می‌شود، قشر آب آن جدا شده و یون توسط قشر آبگریز احاطه می‌شود. سپس کمپلکس یونوفور- یون آزادانه در عرض غشاء انتشار می‌یابد. از آنجایی که تعامل یون و یونوفور یک واکنش تعادلی است، یک غلظت حالت پایدار یون در هر دو سمت غشاء بوجود می‌آید. والینومایسین K^+ را با یک مکانیسم تک انتقالی الکتروژنیک انتقال می‌دهد که با انتقال یک K^+ دارای بار مثبت، یک شیب الکتروشیمیایی در عرض غشاء ایجاد می‌کند (شکل *a*۶۲-۱۲). **نیگریسین** یک هم‌انتقال‌دهنده ناهمسو الکتریکی-خنثی است؛ وقتی گروه کربوکسیل نیگریسین تفکیک‌شده است، به یک یون مثبت نظیر K^+ اتصال یافته که منجر به تولید یک کمپلکس خنثی می‌شود که از عرض غشاء عبور می‌کند. این انتقال‌دهنده با انتشار در میان غشاء یک پروتون را برمی‌گرداند که نتیجه آن تبادل K^+ با H^+ می‌باشد (شکل *b*۶۲-۱۲).

ارتباط بالینی ۶-۱۲

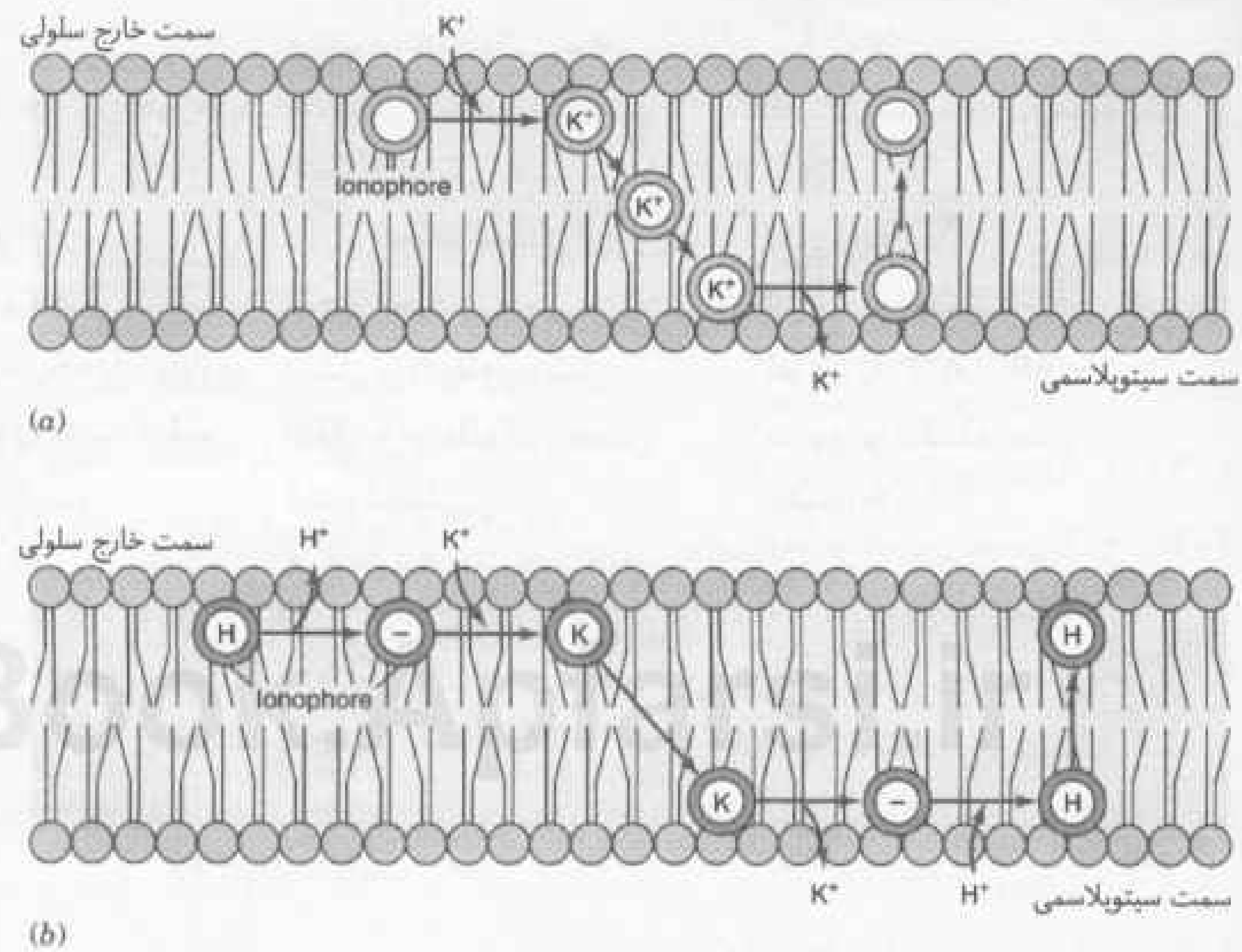
بیماری‌های مرتبط با فوق‌خانواده انتقال‌دهنده‌های ABC

انتقال‌دهنده‌های حاوی کاست اتصال به ATP (ABC) فوق‌خانواده‌ای از پروتئین‌هایی با چندین زیرخانواده است که همگی آنها یک دومن اتصال به ATP حفظ شده و دومن‌های ترانس‌ممبران متنوع دارند. اعضاء این فوق‌خانواده انتقال وابسته به ATP انواع مختلفی از مواد را کاتالیز می‌کنند و در بسیاری از بافت‌ها وجود دارند. در بیماری‌های مختلفی، تعدادی به شکل جهش‌یافته یافت شده‌اند. فهرست انتقال‌دهندهای ABC انتخابی، سوبستراها و بیماری‌های مربوطه به صورت زیر می‌باشد:

بیماری	سوبسترا	انتقال دهنده
بیماری تانژیر	فسفولیپید	ABCA1
سیتوسترولمیا	استرول‌های گیاهی	ABCG5
دژنراسیون عضلانی جوانان رتینیت پیگمنتوزا	فسفاتیدیل اتانل آمین	ABCR

1. Ionophore

گرامیسیدین A یک پپتید ۱۵ ریشه‌ای حاوی اسیدهای آمینه D و L متناوب است. در داخل غشاء، این پپتید تولید یک مارپیچ β کرده و با دیمریزاسیون تولید یک کانال عرض غشایی بلند (۲۵ Å) و باریک (قطر ۵ Å) می‌کند (شکل ۶۳-۱۲). ریشه‌های قطبی داخل کانال را پوشانده و گروه‌های آبگریز در محیط کانال قرار داشته و با غشاء لیپیدی در تعامل می‌باشد. این ساختمان اجازه عبور آب و کاتیون‌های یک‌ظرفیتی و نه دوظرفیتی را می‌دهد. سرعت جریان یون از طریق پیوستن و تفکیک منومرها کنترل می‌شود.



شکل ۶۲-۱۲ مکانیسم فعالیت‌های یونوفورتیک والینومایسین و نیگریسین. (a) انتقال توسط والینومایسین. (b) انتقال توسط نیگریسین. I اشاره به یونوفور دارد. کمپلکس والینومایسین- K^+ بار مثبت دارد و جابه‌جایی K^+ الکتروژنیک بوده و سبب جدایی بارها در عرض غشاء می‌شود. نیگریسین K^+ را در تبادل با H^+ در عرض غشاء جابه‌جا می‌کند و این مکانیسم از نظر الکتریکی خنثی می‌باشد.

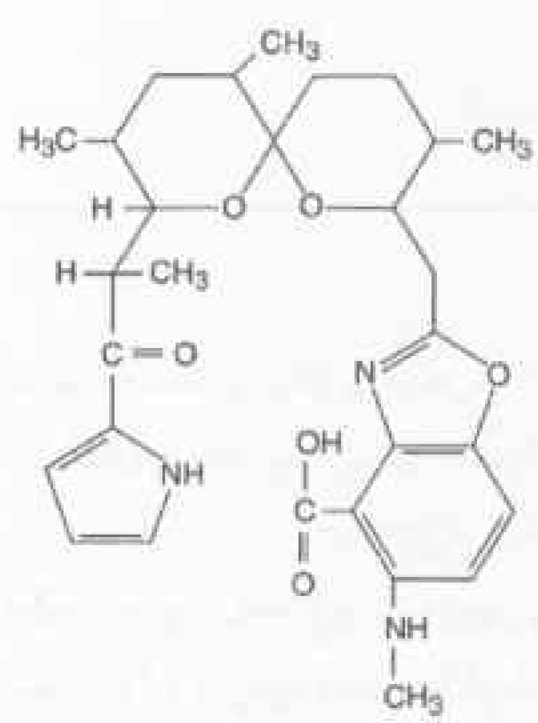


شکل ۶۳-۱۲ فعالیت گرامیسیدین A. دو ملکول گرامیسیدین A از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی در دو انتهای اسید آمینه‌ای این پپتیدها تولید دیمری می‌کنند که یک کانال را در داخل غشاء به‌وجود می‌آورند.

ارتباط بالینی ۶-۱۲ (ادامه)

ABC7	آهن؟	کم‌خونی سیدروبلاستیک همراه با آتاکسی
BSEP	املاح صفراوی	کلستاز داخل کبدی خانوادگی پیشرونده
MRP1	گزنوبیوتیک‌ها	مقاومت چنددارویی
MRP2	دی‌گلوکورونیدهای بیلی‌روبین	سندروم دوبین-جانسون
PGY3	فسفاتیدیل کولین زنجیر بلند	کلستاز حاملگی
TAP1	انتقال‌دهنده پپتیدی	اسپوندیلیت انکیلوزان دیابت قندی وابسته به انسولین بیماری سلیاک

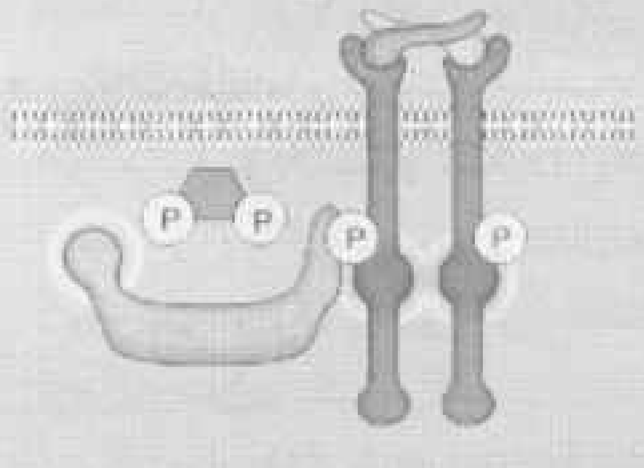
توجه داشته باشید که بیماری‌های با درگیری انتقال‌دهنده‌های ABC همراه با حالات پاتوفیزیولوژیکی مختلفی هستند که تعدادی از بافت‌ها مختلف و سیستم‌های بیوشیمیایی متفاوت را در برمی‌گیرند. برای فهرست کامل انتقال‌دهنده‌های ABC و بیماری‌های مربوطه به:
http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm
مراجعه کنید.



شکل ۶۱-۱۲ ساختمان A23187، یک یونوفور Ca^{2+}.



۱۳



اساس هدایت پیام

مفاهیم کلیدی

- ارتباط بین سلول‌ها مستلزم پیام‌رسانی بین‌سلولی از طریق ملکول‌های ترشحی (هورمون‌ها، نوروترانسمیترها، و سایر مدیاتورها) و آبشارهای پیام‌رسانی می‌باشد که توسط گیرنده‌هایی تنظیم می‌شوند که خود به ملکول‌های ترشحی اتصال می‌یابند. گیرنده‌ها عبارتند از: (۱) پروتئین‌های سطح سلولی که به ملکول‌های آبدوست یا بزرگ ترشحی اتصال می‌یابند، و (۲) پروتئین‌های داخل سلولی که به ملکول‌های آبگریز ترشحی متصل می‌شوند.
- گیرنده‌های سطح سلولی واکنش‌هایی را آغاز می‌کنند که سریعاً غلظت داخل‌سلولی ملکول‌های کوچک پیامبر دوم نظیر یون‌های Ca^{2+}، یا متابولیت‌های لیپیدی را تغییر می‌دهند.
- انتقال پیام‌های داخل‌سلولی توسط دو نوع اصلی سوییچ ملکولی کنترل می‌شوند: (۱) وضعیت فسفریلاسیون پروتئینی؛ و (۲) پروتئین‌های G که وقتی به GTP اتصال یافتند، بین حالات کونفورماسیونی سوییچ می‌کنند

که سبب روشن و خاموش شدن فعالیت پروتئین‌های دیگر می‌شوند.

- برخی پروتئین کینازها و فسفاتازها، جزء فعالیت‌های ذاتی پروتئین‌های گیرنده سطح سلولی هستند که به فاکتورهای رشد اتصال می‌یابند؛ بقیه پروتئین‌های مجزایی هستند که از طریق برقراری ارتباط موقت با پروتئین‌های سطح سلولی و یا با اتصال پیامبرهای دوم کوچک تنظیم می‌گردند.
- پروتئین کینازها و فسفاتازها پیام‌رسانی داخل سلولی را از طریق تغییر وضعیت فسفریلاسیون و عملکرد: (۱) آنزیم‌ها، شامل کینازها و فسفاتازهای دیگر، (۲) کانال‌های یونی و انتقال‌دهنده‌های یونی؛ (۳) فاکتورهای رونویسی؛ و (۴) پروتئین‌های ساختمانی تنظیم‌کننده شکل، اندازه و حرکت سلول، تنظیم می‌کنند.
- پروتئین‌های G از طریق تعامل با پروتئین‌های دیگری تنظیم می‌شوند که سرعت تعویض GTP/GDP توسط پروتئین‌های G را افزایش می‌دهند؛ اینها شامل گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G (GPCR) می‌باشند که بزرگ‌ترین فوق خانواده گیرنده‌های سطح سلولی را تشکیل داده و شامل گیرنده‌های حسی مربوط به بینایی، بویایی و چشایی می‌باشند.
- پروتئین‌های G فعالیت پروتئین‌های دیگر، شامل آنزیم‌های سنتزکننده پیامبرهای دوم، کانال‌های یونی کنترل‌کننده پتانسیل غشایی یا جریان یون‌های تنظیمی، و سایر پروتئین کینازها، را تنظیم می‌کنند.
- مجموعه‌های مختلفی از واکنش‌های پیام‌رسانی بین‌سلولی و داخل-سلولی، شبکه‌های پیام‌رسانی را به‌وجود می‌آورند که به سلول‌های موجود در یک عضو یا بافت اجازه پاسخ‌دهی به تغییر در عملکرد سلول‌های موجود در اعضاء و بافت‌های دیگر را می‌دهند؛ این شبکه‌های پیام‌رسانی هومئوستاز را در کل بدن موجود زنده تضمین می‌کنند.
- بیان یا عملکرد نامناسب پروتئین‌های پیام‌رسانی، شامل ملکول‌های ترشحی، گیرنده‌ها، پروتئین‌های G، و پروتئین کینازها، زمینه‌ساز بیماری‌های انسانی متداول شامل بسیاری از سرطان‌ها، نارسایی قلبی، دیابت و برخی ناهنجاری‌های رفتاری می‌باشند؛ پروتئین‌های پیام‌رسانی اهداف حدود ۵۰٪ داروهایی هستند که استفاده درمانی گسترده‌ای دارند.

۱۳-۱ • هدایت پیام بین سلول‌ها

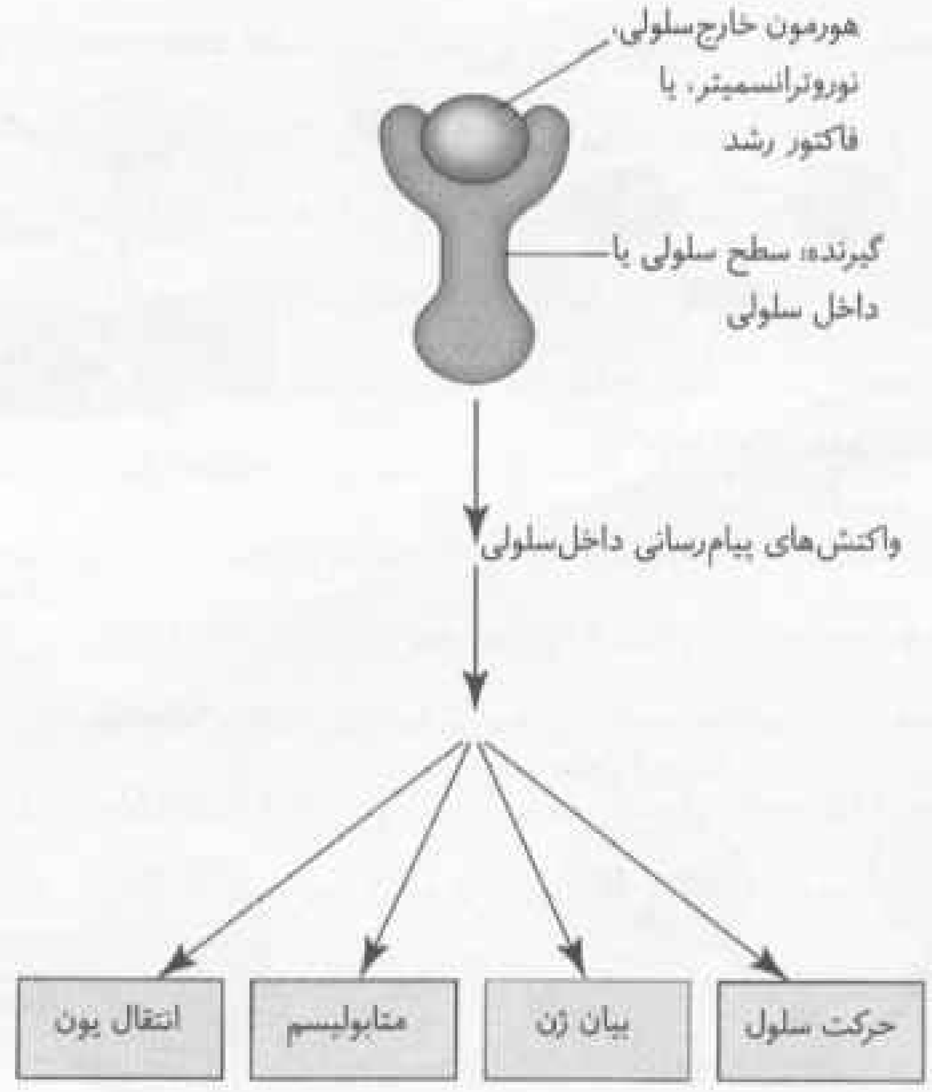
ارتباط[1] یا هدایت پیام[2] بین سلول‌ها و بافت‌ها شامل دو فاز می‌باشد. هدایت پیام بین‌سلولی با انتقال یک پیام از یک سلول به سلول‌های هدف از طریق محیط خارج‌سلولی مشخص می‌شود. هدایت پیام داخل‌سلولی شامل رمزگشایی شیمیایی آن پیام بعد از دریافت توسط سلول‌های هدف می‌باشد؛ این فرایند مستلزم تنظیم مرحله به مرحله پروتئین‌های پیام‌رسان داخل‌سلولی است که نهایتاً منجر به تغییر عملکرد پروتئین‌هایی می‌شود که در متابولیسم، تنظیم ژن، انتقال غشایی و حرکت سلولی دخالت دارند (شکل ۱-۱۳). مجموعه‌ای از پیام‌رسانی بین‌سلولی و داخل‌سلولی این امکان را به سلول‌های موجود در یک عضو می‌دهند که به تغییرات ایجادشده در عملکرد سلول‌های موجود در اعضاء یا بافت‌های دیگر، در جهت تضمین هومئوستاز در کل بدن موجود زنده، پاسخ دهند.

۱۳-۲ • هدایت پیام بین‌سلولی

دو شکل پایه هدایت پیام بین‌سلولی

پیام‌رسانی بین‌سلولی مکانیسم‌هایی را تشریح می‌کنند که توسط آنها یک سلول (سلول «فرستنده[3]») پیامی را برای تغییر عملکرد سلول دیگر (سلول گیرنده[4] یا «هدف[5]») ارسال می‌کند. دو سلول می‌توانند به طرق مختلف با یکدیگر ارتباط برقرار کنند (یعنی، برای یکدیگر اطلاعات ارسال کنند) (شکل ۲-۱۳). در یکی از این راه‌ها، لازم است سلول‌ها

1. Communication 2. Signal transduction 3. Sender 4. Recipient 5. Target



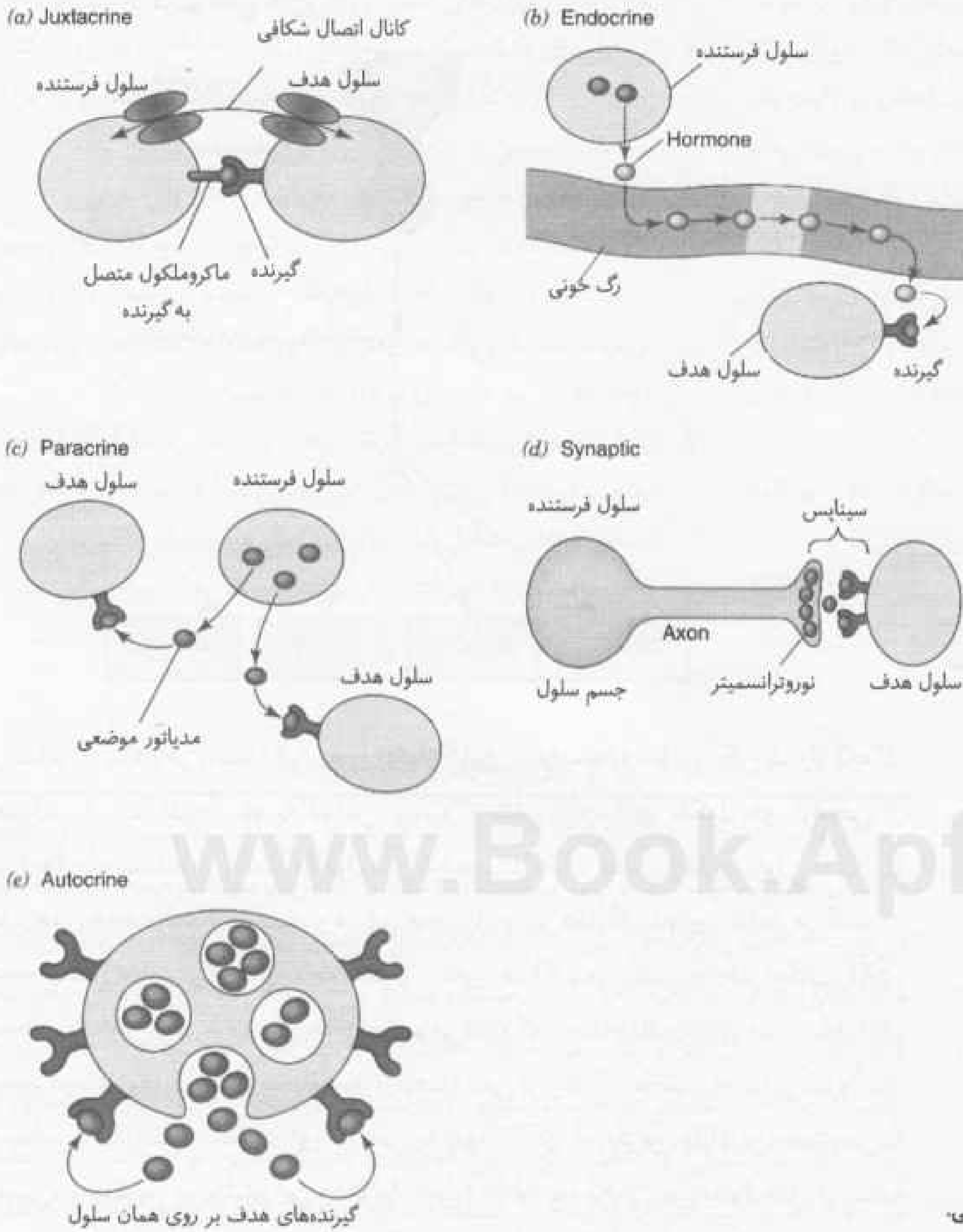
شکل ۱-۱۳ عناصر پایه یک مسیر تبدیل پیام در سطح سلولی.

در تماس با یکدیگر باشند؛ این راه را **ژوکستاکرین**[1] یا **وابسته به تماس**[2] گویند. راه دوم که معمول‌تر است، غیروابسته به تماس بوده و مستلزم آزادسازی **ملکول‌های ترشحی** از سلول‌های فرستنده می‌باشد. ملکول‌های ترشحی از میان فضای خارج‌سلولی به‌سمت سلول‌های هدف انتشار می‌یابند و در این محل با پروتئین‌های گیرنده‌ای[3] تعامل می‌کنند که نتیجه آن فعال‌سازی پیام‌رسانی داخل سلولی و تغییر عملکرد می‌باشد. راه اخیر امکان برقراری ارتباط بین‌سلولی را در میان سلول‌هایی فراهم می‌سازد که فاصله زیادی، برای مثال سلول‌های موجود در بافت‌ها یا اعضاء مختلف، و یا فاصله کمی از یکدیگر دارند. پیام‌رسانی غیروابسته به تماس و به‌واسطه ملکول‌های ترشحی به چهار شکل **آندوکرین**، **پاراکرین**، **سیناپسی** یا عصبی، و **اتوکرین** می‌باشد. این راه‌ها براساس (۱) فاصله واقعی بین سلول‌های فرستنده و هدف، و (۲) ماهیت بیوشیمیایی ملکول‌های ترشحی تمایز داده می‌شوند.

پیام‌رسانی ژوکستاکرین یا وابسته به تماس

در پیام‌رسانی ژوکستاکرین، سلول‌ها با دو مکانیسم ارتباط برقرار می‌کنند. یکی از این مکانیسم‌ها از طریق کانال‌های اتصال شکافی[4] می‌باشد که امکان انتقال مستقیم یون‌های کوچک، متابولیت‌ها و ملکول‌های پیامبر دوم بین سلول‌های مجاور را فراهم می‌سازند. جزئیات ساختمان و عملکرد این کانال‌ها در صفحه ۶۴۷ و اشکال ۴۱-۱۲ و ۴۲-۱۲ شرح داده شده است. مکانیسم دوم مستلزم تعامل یک پروتئین بیان‌شده در سطح سلول فرستنده با یک پروتئین در سطح سلول هدف می‌باشد (شکل ۲a-۱۳). این تعامل کونفورماسیون پروتئین گیرنده

1. Juxtacrine 2. Contact dependent 3. Receptor 4. Gap junction channels



شکل ۲-۱۳ **پنج طریق اصلی تبدیل پیام داخل‌سلولی.**

را تغییر داده و آغاز آبشاری از حوادث پیام‌رسانی داخل‌سلولی در سلول هدف می‌باشد که منجر به تغییر عملکرد آن سلول می‌شود. عناصر مهم پیام‌رسانی ژوکستاکرین شامل انواع مختلفی از پروتئین‌ها، نظیر اینتگرین‌ها، می‌باشد که در چسبندگی سلول به سلول و تنظیم شکل و حرکت سلولی نقش دارند.

پیام‌رسانی آندوکرین

این نوع پیام‌رسانی مستلزم انتقال پیام بین سلول‌هایی است که فاصله کوتاه یا بلندی با یکدیگر دارند. سلول‌های فرستنده تخصص‌یافته موجود در بافت‌های غده‌ای، ملکول‌هایی را تحت عنوان هورمون‌ها سنتز، بسته‌بندی و ترشح می‌کنند (شکل ۲b-۱۳). طبق تعریف،

هورمون‌ها ملکول‌هایی هستند که برای انتقال به سلول‌های هدف موجود در بافت‌های مختلف که در فواصل دور قرار دارند، به‌داخل خون ترشح می‌شوند. این نوعی انتشار پیام به دوردست می‌باشد، زیرا خون هورمون را به اکثر انواع سلول‌های موجود در اکثر بافت‌ها انتقال می‌دهد. با وجود اینکه اکثر سلول‌های موجود در بدن در تماس با هورمون قرار می‌گیرند، ولی تنها سلول‌هایی به‌عنوان هدف می‌باشند که گیرنده‌های اختصاصی مربوط به آن هورمون را بیان می‌کنند. لازم است به دو جنبه مهم پیام‌رسانی آندوکرین اشاره گردد. اول، از آنجایی‌که هورمون به‌داخل حجم کل خون ترشح می‌شود، تا زمان رسیدن به سلوهای هدف موجود در بافت‌های محیطی، چندین دفعه رقیق می‌شود. غلظت هورمون موجود در خون و فضاهای بینابینی همیشه، حتی در هنگام حداکثر ترشح از غده منبع، پایین (غلظت‌های پیکومولار تا نانومولار، یعنی، 10^{-12} تا 10^{-9}M) می‌باشد. با توجه به غلظت پایین هورمون‌ها، لازم است گیرنده‌های موجود در سلول هدف تمایل و ویژگی بسیار بالایی برای یک هورمون خاص داشته باشند. یکی از نتایج این تمایل بالا این است که وقتی هورمون اتصال یافت، به‌راحتی نمی‌تواند از گیرنده خود جدا شود. دوم، به دلیل حجم و ظرفیت بالای خون، برای افزایش یا کاهش غلظت یک هورمون در خون نیاز به زمان قابل‌توجهی می‌باشد. بعد از ترشح، غلظت هورمون موجود در گردش خون و مایع بینابینی می‌تواند دقایق زیادی و حتی چندین ساعت بالا نگه داشته شود. این غلظت بالا به‌همراه تمایل بالای تعاملات هورمون-گیرنده، اثرات مهمی را بر روی مکانیسم‌هایی دارد که توسط آنها سلول‌های هدف پاسخ خود به هورمون را خاموش می‌کنند. این موضوع همچنین تضمین می‌نماید که پیام‌رسانی داخل‌سلولی توسط سلول هدف، برای مدت طولانی ادامه یابد.

پیام‌رسانی پاراکرین

در این نوع پیام‌رسانی، سلول فرستنده ملکول‌های پیام‌رسان را برای انتقال به مسافت‌های طولانی به‌داخل گردش خون ترشح نمی‌کند، بلکه این ملکول‌ها را به‌داخل محیط موضعی اطراف خود آزاد می‌نماید (شکل ۲c-۱۳). این موضوع شدیداً سبب محدودیت در فاصله‌ای می‌شود که این ملکول‌ها می‌توانند (به‌طریق انتشار غیرفعال) حرکت کنند و بنابراین سبب محدودیت پاسخ به سلول‌های هدفی می‌شود که در مجاورت سلول فرستنده قرار دارند. با توجه به‌عمل موضعی، ملکول‌های ترشحی که برای پیام‌رسانی پاراکرین مورد استفاده قرار می‌گیرند، مدیاتورهای موضعی نامیده می‌شوند. از آنجایی‌که برخلاف هورمون‌های ترشحی، مدیاتورهای موضعی زیاد رقیق نمی‌شوند، غلظت آنها در نزدیکی سلول‌های هدف می‌تواند نسبتاً بالا (در دامنه نانومولار تا میکرومولار، یعنی، 10^{-9} تا 10^{-6}M) باشد. لذا گیرنده‌های سلول هدف مربوط به مدیاتورهای موضعی معمولاً تمایل کمتری برای ملکول‌های ترشحی دارند. این تمایل کمتر به معنی آن است که در

هنگام کاهش غلظت خارج‌سلولی، مدیاتور موضعی می‌تواند سریعاً از گیرنده جدا شود. به‌علاوه، به دلیل آنکه مدیاتور به‌طور موضعی به داخل حجم خارج‌سلولی کوچکی ترشح می‌شود، غلظت آن در سلول هدف، به واسطه انتشار سریع و رقیق‌سازی در فضای بافتی بزرگتر، تنها یک افزایش موقتی را نشان می‌دهد. لذا از پیام‌رسانی پاراکرین برای برقراری ارتباط سریع و موضعی بین سلول‌ها استفاده می‌شود.

پیام‌رسانی سیناپسی یا عصبی

این نوع پیام‌رسانی پاراکرین برای سلول‌های عصبی اختصاصی است که امتدادهای سلولی تخصص‌یافته‌ای (آکسون‌ها) دارند که خود به خارج و به نزدیکی سلول هدفی امتداد می‌یابند که معمولاً یک نورون دیگر یا یک سلول عضلانی است (شکل d۲-۱۳). سیناپس‌های موجود در بین یک نورون و سلول‌های هدف آن، یک فضای خارج‌سلولی محدود را به وجود می‌آورند که نورون‌ها ملکول‌های پیام‌رسان، تحت عنوان نوروترانسمیترها، را به داخل آن ترشح می‌کنند. در این فضای سیناپسی اختصاصی، نوروترانسمیترها تنها فواصل بسیار کوتاهی را تا رسیدن به سلول هدف طی می‌کنند. به دلیل این فاصله بین سلولی کوتاه و حجم سیناپسی محدود، غلظت موضعی نوروترانسمیتری که به سلول هدف می‌رسد می‌تواند بسیار زیاد (در دامنه میکرومولار تا میلی‌مولار، یعنی، 10^{-6} تا 10^{-3} M) باشد. لذا گیرنده‌های موجود در سلول هدف می‌توانند تمایل نسبتاً پایینی را برای نورو-ترانسمیتر داشته باشند. این تمایل پایین تضمین می‌نماید که نوروترانسمیترها بتوانند به دنبال کاهش غلظت موضعی خود، سریعاً از گیرنده‌های موضعی مربوطه جدا شوند. این موضوع برای خاتمه بسیار سریع (ظرف میلی‌ثانیه) انتقال عصبی از نورون پیش‌سیناپسی به اهداف پس‌سیناپسی آن ضروری است.

پیام‌رسانی اتوکرین

این نوع پیام‌رسانی پاراکرین زمانی رخ می‌دهد که یک نوع سلول، هم سلول فرستنده و هم سلول هدف باشد (شکل e۲-۱۳). پیام‌رسانی اتوکرین اغلب در هنگام رشد بافت، نمو عضو، و یا پاسخ‌های ایمنی و التهابی مورد استفاده قرار می‌گیرد. خصوصیات عمومی پیام‌رسانی اتوکرین همانند پیام‌رسانی پاراکرین غیرسیناپسی است، به غیر از اینکه سلول فرستنده هم ملکول ترشحی (اغلب یک پلی‌پپتید بزرگ فاکتور رشد) و هم گیرنده‌ای برای آن ملکول را فراهم می‌کند. برای مثال، نمو بافتی زودرس اغلب مستلزم افزایش بیان یک فاکتور رشد و گیرنده آن فاکتور رشد توسط یک سلول اجدادی یا بنیادی است. فاکتور رشد آزادشده سبب القاء فعال‌سازی اتوکرین گیرنده هدف خود در جهت شروع همانندسازی سلول بنیادی ابتدایی و سلول‌های اولاد آن می‌شود.

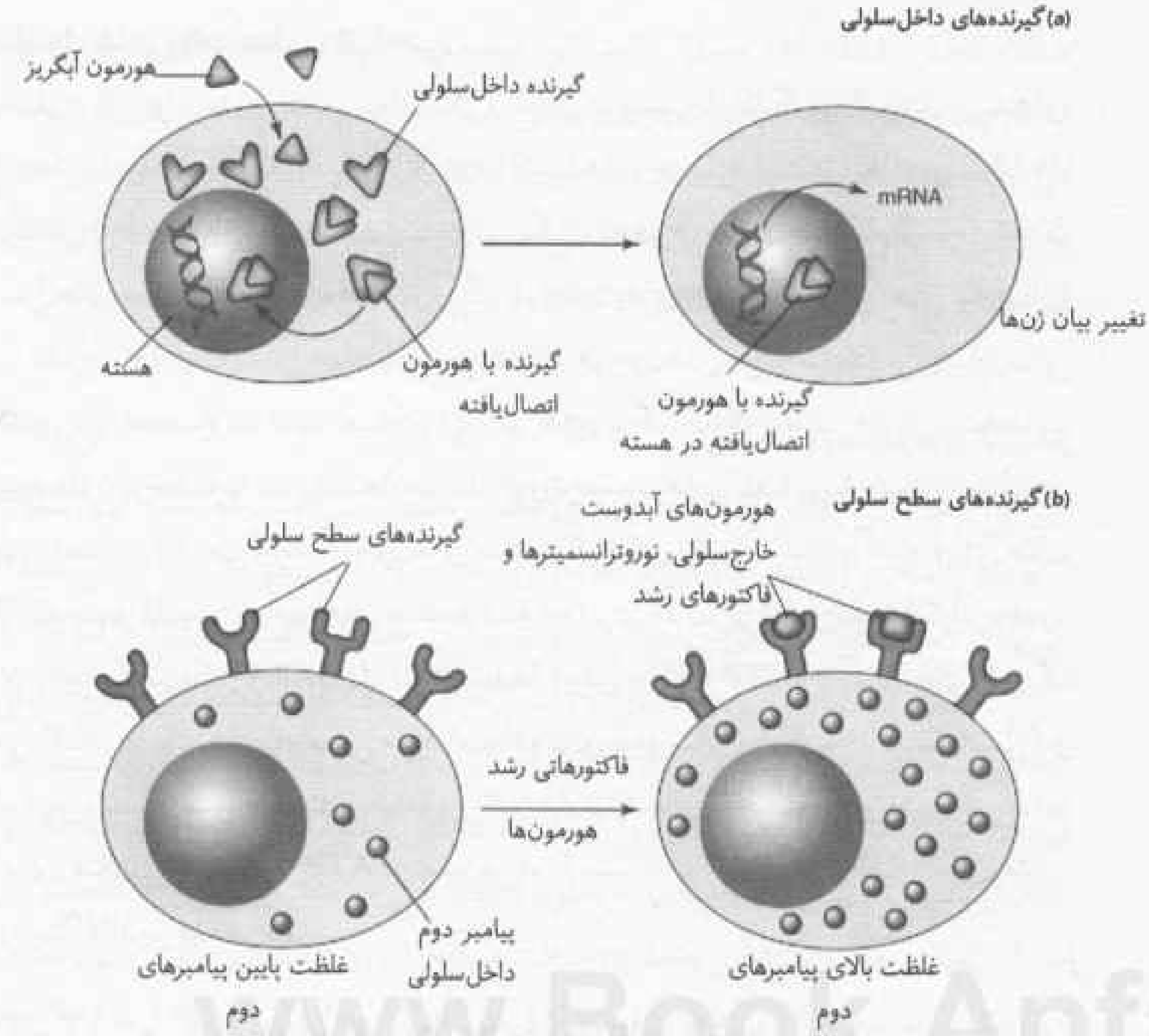
ملکول‌های پیام‌رسانی ترشحی

بسیاری از انواع ملکول‌های بیولوژیکی، شامل پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها، پپتیدهای کوچک، اسیدهای آمینه، آمین‌ها، لیپیدها (اسیدهای چرب یا استروئیدها)، نوکلئوتیدها، نوکلئوزیدها و گازها (برای مثال، اکسید نیتریک)، به عنوان ملکول‌های پیام ترشحی توسط سلول‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. تفاوت‌های اصلی بین ملکول‌های پیام‌رسان، در اندازه و حلالیت نسبی آنها در آب می‌باشند. هورمون‌های مورد استفاده برای پیام‌رسانی آندوکرین، محصولات اسید آمینه‌ای (پروتئین‌های بزرگ، گلیکوپروتئین‌ها، پلی‌پپتیدها، یا پپتیدهای کوچک) یا استروئیدها هستند. نوروترانسمیترهایی که در پیام‌رسانی سیناپسی مورد استفاده قرار می‌گیرند، ملکول‌های ساده و کوچکی نظیر اسیدهای آمینه (برای مثال، گلوتامات و گلیسین)، آمین‌های استخلاف‌شده (برای مثال، اپی‌نفرین، استیل‌کولین، اسید γ-آمینوبوتیریک [GABA])، نوکلئوتیدها (برای مثال، **ATP**) یا پپتیدهای کوچک می‌باشند. مدیاتورهای موضعی مورد استفاده برای پیام‌رسانی پاراکرین (غیرسیناپسی) و اتوکرین، بسیار متنوع هستند و شامل پروتئین‌ها، پپتیدهای کوچک، ملکول‌های آلی ساده (برای مثال، هیستامین، **ATP** و آدنوزین)، یا مشتقات اسیدهای چرب (برای مثال، پروستاگلاندین‌ها) می‌باشند.

۱۳-۳ • گیرنده‌های مربوط به ملکول‌های ترشحی

گیرنده‌های مربوط به ملکول‌های ترشحی را می‌توان به دو کلاس اصلی تقسیم نمود: **گیرنده‌های داخل‌سلولی و گیرنده‌های سطح سلولی** (شکل ۳-۱۳). ملکول‌های آبگریز به راحتی از غشاء پلاسمایی سلول‌های هدف عبور می‌کنند و به پروتئین‌های **گیرنده داخل‌-سلولی** اتصال می‌یابند.

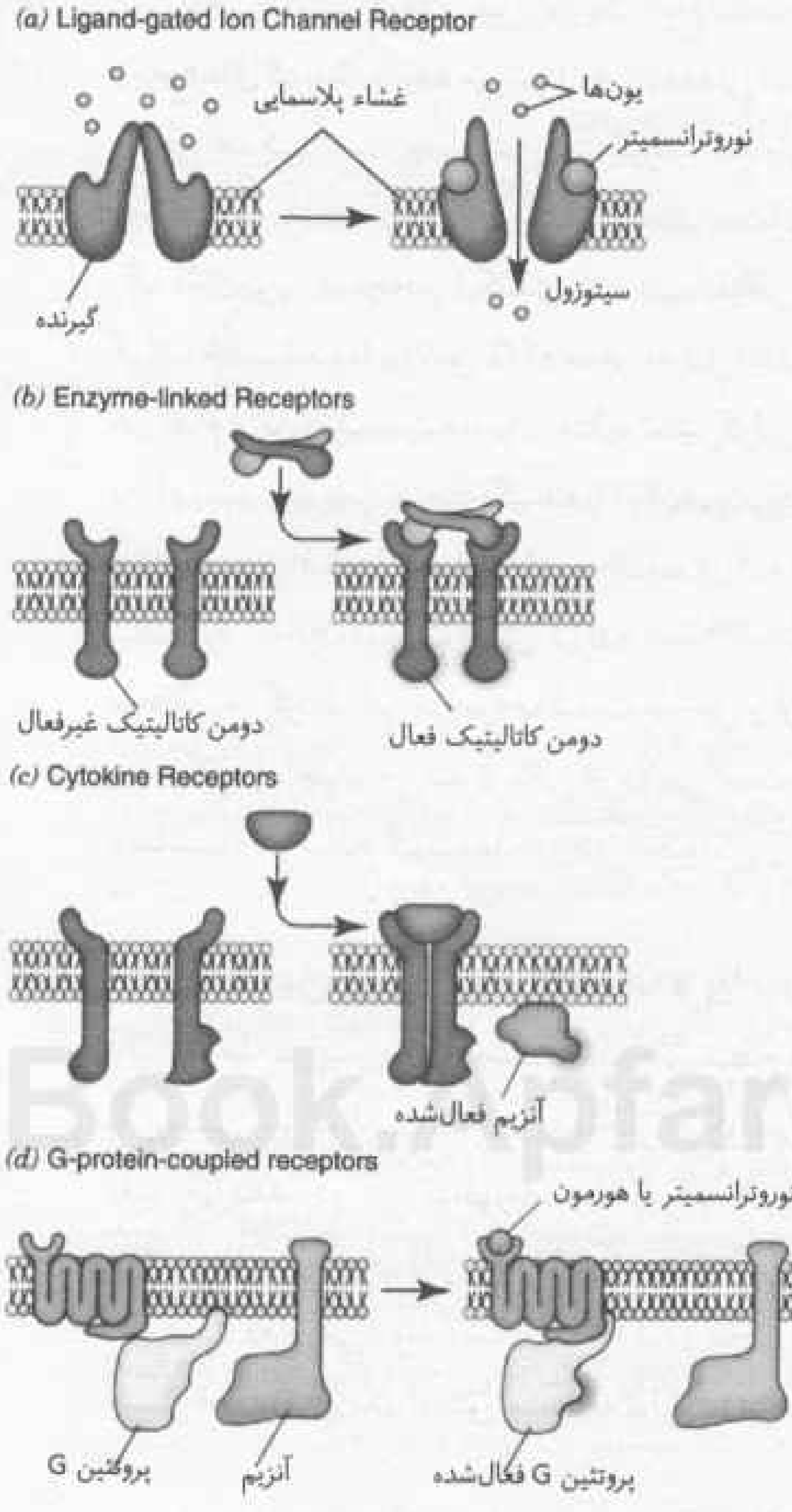
گیرنده‌های داخل‌سلولی برای هورمون‌های استروئیدی ترشحی، مشتقات ویتامین D_3، اسید رتینوئیک و هورمون تیروئید اختصاصی هستند (شکل ۳a-۱۳). اینها یک گروه شدیداً هومولوگوس را با پروتئین‌هایی تشکیل می‌دهند که ارتباط ساختمانی با یکدیگر دارند. در فصل ۲۲ به جزئیات ساختمان و عملکرد این گیرنده‌ها (اشکال ۴۶-۲۲ و ۴۷-۲۲) را ببینید) پرداخته می‌شود. برخی پروتئین سیتوزولی هستند که فقط در زمان اتصال به هورمون، وارد هسته می‌شوند؛ بقیه حتی در غیاب هورمون اتصال‌یافته، وارد هسته می‌شوند. در تمامی موارد، گیرنده‌هایی که به هورمون اتصال می‌یابند، به صورت کمپلکس‌های دیمری (هُمودیمر یا هترودیمر) عمل می‌کنند که به توالی‌های اختصاصی در داخل عناصر تنظیمی فرادست ژن‌های مختلف اتصال یافته و رونویسی و بنابراین بیان پروتئین‌های کدشونده توسط این ژن‌ها را افزایش یا کاهش می‌دهند. به دلیل تأثیر آنها بر روی بیان ژن، فعال‌سازی گیرنده‌های داخل‌سلولی سبب تغییرات طولانی- مدت (چندین ساعت تا چندین روز) در عملکرد سلول‌های هدف می‌شوند.



شکل ۳-۱۳ خصوصیات پایه گیرنده‌های داخل سلولی در مقابل گیرنده‌های سطح سلولی.

گیرنده‌های سطح سلولی جایگاه‌های شناسایی برای اکثریت ملکول‌های پیام‌رسانی هستند که برای عبور سریع از غشاء پلاسمایی سلول هدف، یا بسیار بزرگ (هورمون‌های پروتئینی یا پلی‌پپتیدی) و یا بسیار آبدوست می‌باشند. این ملکول‌های پیام‌رسان از طریق اتصال به گیرنده‌های سطح سلولی که پروتئین‌های درون غشایی هستند، با سلول هدف تعامل می‌کنند (شکل b۳-۱۳). پروتئین‌های گیرنده سطحی با انواع مختلفی از واکنش‌های بیوشیمیایی داخل‌سلولی، تحت عنوان **مسیرها** یا **آبشارهای هدایت پیام** جفت می‌شوند. ابتدایی‌ترین رخداد هدایت پیام که با اتصال یک ملکول پیام به چنین گیرنده‌ای آغاز می‌شود، تغییر کونفورماسیونی در گیرنده می‌باشد که منجر به (۱) تولید ملکول‌های پیام داخل‌سلولی تحت عنوان **پیامبر دوم** (ملکول ترشحی خارج‌سلولی، پیامبر اول است) یا (۲) یک تغییر در پتانسیل الکتریکی غشاء پلاسمایی یا (۳) فعال‌سازی آبشارهای آنزیمی با همکاری پروتئین کینازها، پروتئین فسفاتازها یا پروتئازها، می‌شوند. چهار فوق‌خانواده اصلی گیرنده‌های سطح سلولی که ارتباط ساختمانی و عملکردی دارند و اکثریت مسیرهای ارتباطی بین سلولی را وساطت می‌کنند (شکل ۴-۱۳) عبارتند از: (۱) **گیرنده‌های کانال یونی دریچه‌دار**، (۲) **گیرنده‌های کاتالیتیک یا مرتبط با آنزیم**، (۳) **گیرنده‌های خانواده سیتوکینی** و (۴) **گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G** [1] **(GPCR)**.

1. G protein-coupled receptors



شکل ۴-۱۳ کلاس‌های اصلی گیرنده‌های سطح سلولی برای ملکول‌های پیام ترشح‌شده.

۴-۱۳ • هدایت داخل‌سلولی پیام از طریق گیرنده‌های سطح سلولی

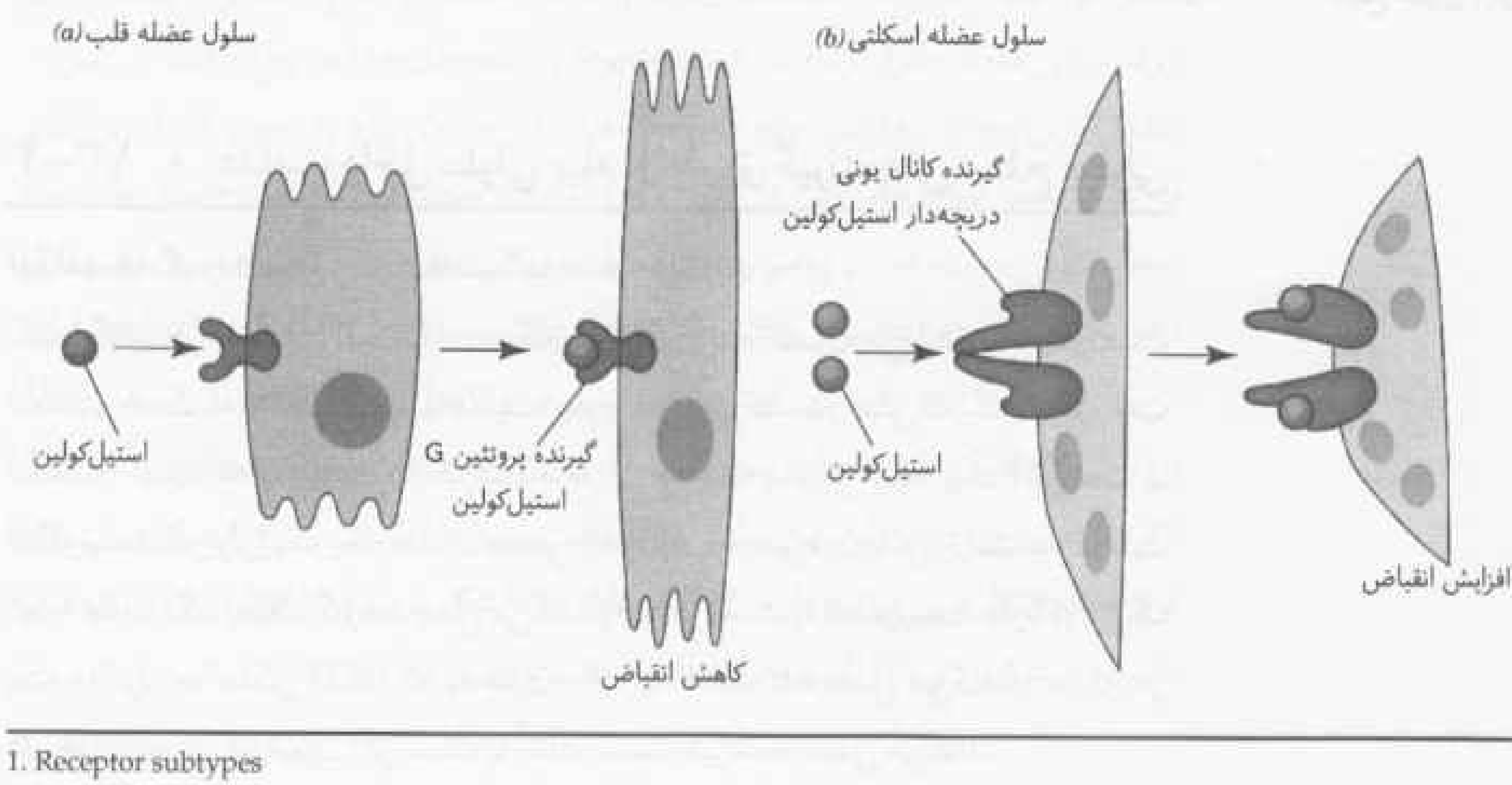
لیگاندها، گیرنده‌ها و تعاملات گیرنده- لیگاند

یک **لیگاند** هر ملکولی است که به یک پروتئین گیرنده اتصال می‌یابد. یک **آگونیست** لیگاندی است که به‌دنبال اتصال، هدایت پیام را فعال می‌کند، در حالی که یک **آنتاگونیست** لیگاندی است که با اتصال به گیرنده، مانع از هدایت پیام می‌شود. یک **آگونیست** یا **آنتاگونیست فیزیولوژیک** یک ملکول طبیعی (همانند یک هورمون یا نوروترانسمیتر) است که به‌عنوان یک لیگاند گیرنده عمل می‌کند. یک **آگونیست** یا **آنتاگونیست فارماکولوژیک** یک ملکول ساختگی است که به‌عنوان یک لیگاند گیرنده عمل می‌کند. بسیاری از داروهای درمانی به‌عنوان آگونیست یا آنتاگونیست گیرنده‌ها عمل می‌کنند.

برخی آگونیست‌های فیزیولوژیک انواع متعددی از گیرنده‌ها را تحریک می‌کنند که **زیرنوع‌های گیرنده**[1] نامیده می‌شوند. این به معنی آن است که یک ملکول پیام‌رسان خارج-سلولی ممکن است به پروتئین‌های گیرنده متفاوتی اتصال یابد که محصولات ژن‌های مختلف می‌باشند. برای مثال، نوروترانسمیتر استیل‌کولین با دو گیرنده تعامل می‌کند، یکی یک کانال یونی دریچه‌دار لیگاندی که سبب انقباض عضله اسکلتی می‌شود و دیگری یک گیرنده جفت‌شده با پروتئین G که منجر به شل‌شدن عضله قلب می‌گردد (شکل ۵-۱۳). هر کدام از نوروترانسمیترها، برای مثال، استیل‌کولین، سروتونین و دوپامین، یک دوجین یا تعداد بیشتری از زیر نوع‌های گیرنده را شناسایی می‌کنند. هر زیرنوع گیرنده می‌تواند به شکل متمایزی در بافت‌ها یا سلول‌های مختلف و یا به شکل همزمان در یک بافت یا سلول بیان شود. به‌علاوه، زیرنوع‌های گیرنده اغلب سبب فعال‌سازی پاسخ‌های هدایت پیام مخالفی می‌گردند. این موضوع به‌شدت طراحی و آزمایش آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های ساختگی را پیچیده می‌کند و یکی از دلایلی است که چرا اکثر داروها در هنگام استفاده نامناسب، در سطح گیرنده‌ها عوارض خطرناکی را به‌وجود می‌آورند.

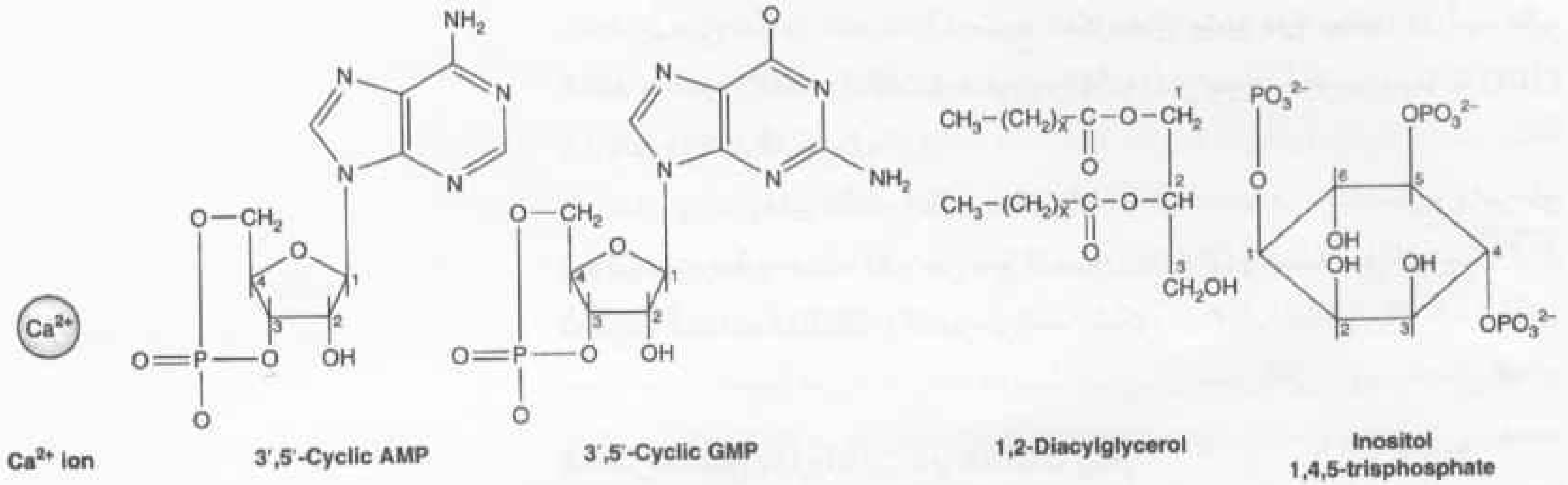
ارتباطات بین گیرنده‌ها، افکتورها و پیامبرهای دوم

اولین مرحله در پیام‌رسانی توسط گیرنده‌های سطح سلولی، اتصال آگونیست خارج‌سلولی به پروتئین گیرنده است که انرژی داخلی و کونفورماسیون ساختمانی پروتئین گیرنده را تغییر می‌دهد. در این کونفورماسیون، گیرنده با **پروتئین‌های افکتوری** تعامل می‌کند که پروتئین‌های پیام‌رسان (آنزیم یا کانال) بعد از گیرنده هستند، و توسط گیرنده متصل به آگونیست فعال می‌شوند (شکل ۴-۱۳). در برخی موارد، خود پروتئین گیرنده نیز افکتور است. فعال‌سازی یک افکتور منجر به تولید **پیامبرهای دوم** یا تغییراتی در پتانسیل غشایی



شکل ۵-۱۳ خصوصیات پایه زیرنوع‌های گیرنده به‌عنوان پروتئین‌های گیرنده با عملکرد متفاوت که به یک ملکول پیام‌رسانی خارج‌سلولی اتصال می‌یابند.

1. Receptor subtypes



شکل ۶-۱۳ ساختمان چهار ملکول پیامبر دوم.

می‌شود. برخی گیرنده‌ها مستقیماً با پروتئین‌های افکتور تعامل می‌کنند، در حالی که گیرنده‌های دیگر برای تعامل با افکتور نیاز به **پروتئین‌های جفت‌کننده** یا **مبدل**[1] دارند. پروتئین‌های تنظیمی اتصالی به GTP (پروتئین‌های G) یک کلاس بسیار مهم این نوع پروتئین‌های جفت‌کننده هستند.

آنزیم‌های افکتور ممکن است اجزاء ذاتی یک پروتئین گیرنده (برای مثال، تیروزین کینازهای گیرنده‌ای) و یا پروتئین‌های مجزایی (برای مثال، تیروزین کینازهای غیرگیرنده‌ای) باشند. این افکتورها می‌توانند از نوع پروتئین‌های درون غشایی (برای مثال، آدنیلات سیکلاز) و یا از نوع پروتئین‌های سیتوزولی (برای مثال، گوانیلات سیکلاز) باشند؛ اینها شامل نوکلئوتید سیکلازها، فسفولیپازها، پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها می‌باشند. در قسمت بعد به بحث پیرامون آنها پرداخته خواهد شد. افکتورهای کانال یونی اجزاء ذاتی برخی گیرنده‌ها (کانال‌های یونی دریچه‌دار لیگاندی) هستند، در حالی که موارد دیگر به‌طور غیرمستقیم از طریق پروتئین‌های G یا پیامبرهای دوم، توسط گیرنده‌ها تنظیم می‌شوند.

پیامبرهای دوم ملکول‌های داخل‌سلولی کوچکی هستند که پیام ابتدایی حاصل از گیرنده‌های فعال‌شده توسط آگونیست را منتقل نموده و تقویت می‌کنند (شکل ۶-۱۳). این پیامبرها می‌توانند یون‌های معدنی و یا محصولات آلی حاصل از واکنش‌های آنزیمی باشند.

یون‌هایی که از میان کانال‌های تحت تنظیم گیرنده عبور می‌کنند، به دو طریق به‌عنوان پیامبر دوم عمل می‌کنند. در صورتی‌که جریان یونی به اندازه‌کافی زیاد باشد، غلظت سیتوزولی برخی یون‌های تنظیمی می‌تواند به میزان قابل‌توجهی تغییر کند؛ Ca^{2+} یون تنظیمی داخل سلولی اصلی است. در صورتی‌که جریان یونی خاصی در عرض غشاء پلاسمایی غالب باشد، پتانسیل غشایی به سمت پتانسیل تعادلی برای آن یون کشانده خواهد شد. این تغییر منجر به دپولاریزاسیون یا هیپرپولاریزاسیون غشاء می‌گردد.

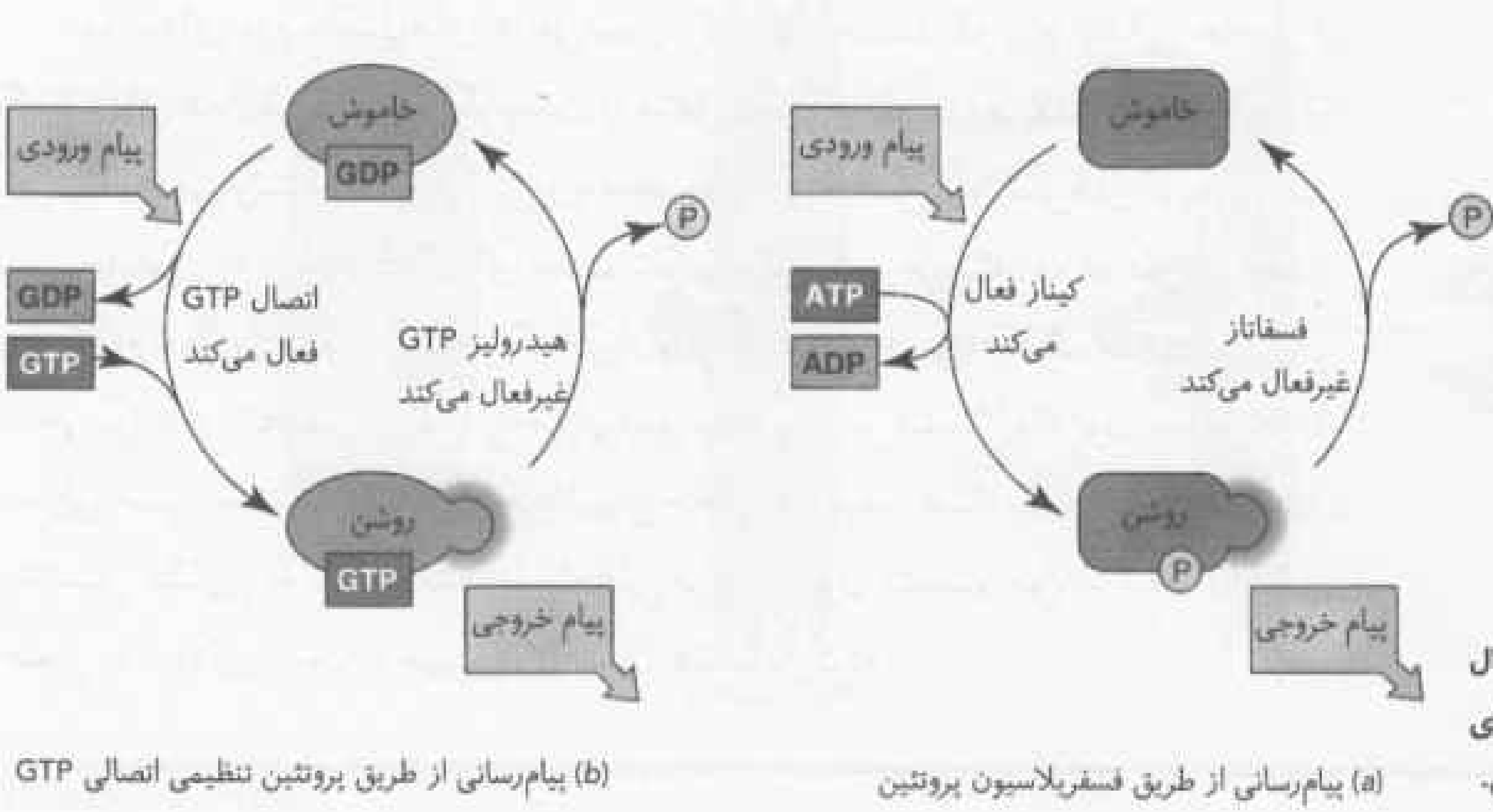
1. Coupling or transducing proteins

آنزیم‌های افکتور اغلب تولید سریع **ملکول‌های پیامبر دوم محلول در آب**، نظیر AMP حلقوی (cAMP)، GMP حلقوی (cGMP)، و اینوزیتول تریس‌فسفات (IP3)، را کاتالیز می‌کنند (شکل ۶-۱۳).

سایر پروتئین‌های افکتور، نظیر فسفولیپازها یا لیپید کینازها، تولید سریع **پیامبرهای دوم لیپیدی مرتبط** با غشاء، نظیر دی‌آسیل‌گلیسرول (DAG) و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳، ۴، ۵-تریس‌فسفات (PIP3) را کاتالیز می‌کنند (شکل ۶-۱۳).

فسفریلاسیون پروتئینی در هدایت پیام

اکثر مسیرهای هدایت پیام داخل‌سلولی مستلزم تغییراتی در وضعیت فسفریلاسیون برخی پروتئین‌ها هستند. فسفریلاسیون پروتئین‌ها می‌تواند ساختمان‌های دوم، سوم و چهارم آنها را تغییر داده و سبب ایجاد تغییراتی در عملکرد آنها شود. این نوع فسفریلاسیون‌ها نیاز به فعالیت تنظیم‌شده انواع مختلفی از **پروتئین کینازها** و **پروتئین فسفاتازها** دارد (شکل ۷a-۱۳). پروتئین کینازها براساس ویژگی آنها برای اسیدهای آمینه خاص طبقه‌بندی می‌شوند. اکثر پروتئین کینازها که توسط پیامبرهای دوم فعال می‌شوند، پروتئین‌های اختصاصی را بر روی ریشه‌های سرین یا ترئونین فسفریله می‌کنند. بسیاری از فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها نیز سبب تحریک کینازهایی می‌شوند که پروتئین‌ها را بر روی ریشه‌های تیروزین فسفریله می‌کنند. این پروتئین تیروزین کینازها نقش‌های مهمی را در تنظیم رشد و تمایز سلولی بازی می‌کنند. سوبستراهای پروتئینی سرین-ترئونین کینازها یا تیروزین کینازها بسیار متنوع هستند و شامل آنزیم‌های متابولیک، کانال‌های یونی، فاکتورهای رونویسی یا پروتئین کینازهای دیگر هستند. پروتئین فسفاتازها همچنین برای ریشه‌های سرین-ترئونین فسفات یا تیروزین فسفات ویژگی دارند. توانایی برخی پروتئین کینازها در فسفریلاسیون



(a) پیام‌رسانی از طریق فسفریلاسیون پروتئین

(b) پیام‌رسانی از طریق پروتئین تنظیمی اتصالی GTP

شکل ۷-۱۳ فسفریلاسیون پروتئین در برابر اتصال نوکلئوتید گوانینی به‌عنوان دو نوع اصلی سوییچ‌های ملکولی برای تغییر عملکرد پروتئین طی پیام‌رسانی.

و فعال‌سازی پروتئین‌های هدف که خودشان پروتئین کیناز هستند، همکاری **آبشارهای پروتئین کینازی**[1] در تنظیم پاسخ‌های سلولی پیچیده را مورد تأکید قرار می‌دهد. این آبشارها اغلب عناصر کلیدی در فرایند **تقویت**[2] هستند که واکنش‌های پیام‌رسانی داخل سلولی را مشخص می‌کنند که با اتصال به گیرنده‌های سطح سلولی آغاز می‌شوند.

پروتئین کینازها می‌توانند به چندین طریق توسط گیرنده‌ها تنظیم شوند. برخی تیروزین کینازها اجزاء ذاتی ساختمان پروتئین گیرنده هستند (برای مثال، تیروزین کینازهای گیرنده‌ای)، در حالی‌که بقیه پروتئین‌های سیتوزولی می‌باشند که به‌طور موقتی به گیرنده‌های فعال‌شده متصل می‌شوند (برای مثال، تیروزین کینازهای غیرگیرنده‌ای که به گیرنده‌های سیتوکینی اتصال می‌یابند). اکثر سرین-ترئونین کینازها پروتئین‌های محلولی هستند که با یک افزایش در غلظت پیامبر دوم (برای مثال، پروتئین کیناز وابسته به cAMP) فعال می‌شوند. به‌علاوه، انواع متعددی از فسفاتازها وجود دارند که پیام‌های حاصل از پروتئین کینازهای فعال‌شده توسط گیرنده یا پیامبر دوم را معکوس می‌کنند.

پروتئین‌های تنظیمی اتصالی GTP در هدایت پیام

پروتئین‌های G که از نظر عملکرد با گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G جفت می‌شوند، متعلق به یک خانواده بزرگتر پروتئین‌ها هستند که به‌عنوان بخشی از عملکرد سلولی خود، به GTP اتصال یافته و آن را هیدرولیز می‌کنند (شکل *b*۷-۱۳). این **GTPase**ها یک نقش **سوییچ ملکولی** مهم دارند و در فعالیت‌های بیولوژیکی مهمی نظیر شروع، طویل‌سازی و خاتمه سنتز پروتئین؛ همایش میکروتوبولی؛ تنظیم فعالیت آنزیمی؛ و تردد غشایی، همکاری می‌کنند. بسیاری از این پروتئین‌های اتصال به GTP «سوییچ» از انواع پروتئین‌های منومری هستند که سبب تمایز آنها از پروتئین‌های G جفت‌شده با گیرنده تریمری می‌شوند. تمامی پروتئین‌های اتصالی GTP (ملکول‌های منومری و تریمری)، برحسب اتصال به گوانوزین ′۵- دی‌فسفات (GDP) یا GTP، کونفورماسیون‌ها و فعالیت‌های متفاوتی دارند. شکل متصل به GDP با پروتئین دیگری (یک فاکتور **تعویض نوکلئوتید گوانینی**[3] یا **GEF**) تعامل می‌کند که تعویض GDP با GTP را کاتالیز می‌نماید. شکل متصل به GTP به پروتئین افکتور فرودست اتصال یافته و فعالیت آن را تغییر می‌دهد. با فعالیت GTPase شکل متصل به GTP به شکل متصل به GDP تبدیل می‌شود که توانایی پایینی در اتصال به پروتئین‌های افکتور دارد و می‌بایست برای کسب دوباره کونفورماسیون فعال با یک GEF تعامل کند. یکی از فعالیت‌های اصلی بسیاری از گیرنده‌های سطح سلولی، آغاز تعویض GDP/GTP، به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم، می‌باشد که منجر به فعال‌سازی پروتئین G می‌گردد.

1. Protein kinase cascades　2. Amplification　3. Guanine nucleotide exchange factor

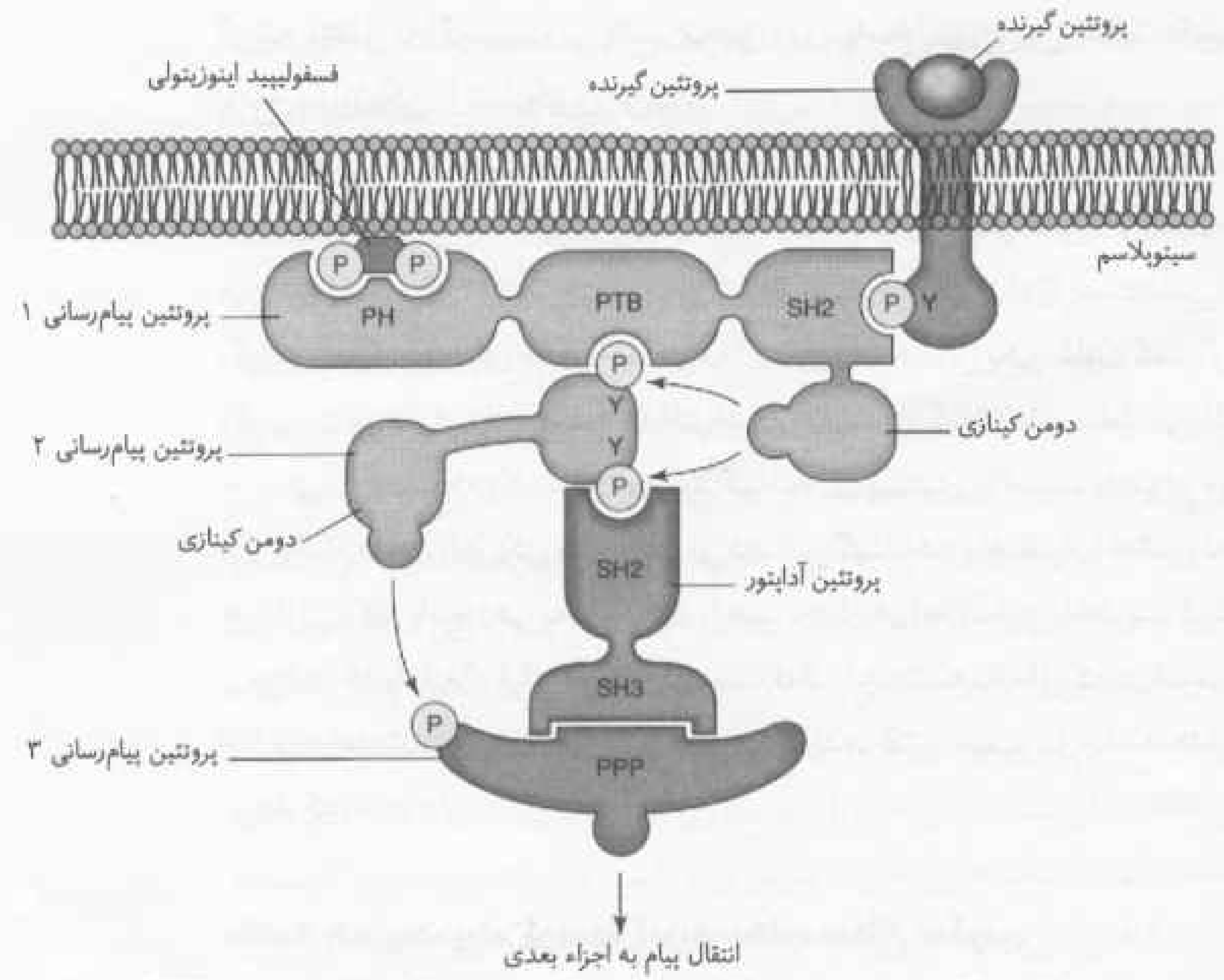
سایر اجزاء آبشارها و کمپلکس‌های پیام‌رسانی به‌واسطه گیرنده

علاوه‌بر پروتئین‌های افکتور، پیامبرهای دوم، پروتئین‌های G تریمری و پروتئین کینازها، احتمال دارد انواع مختلف زیادی از پروتئین‌های داخل‌سلولی در مسیرهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی به‌واسطه گیرنده سطح سلولی همکاری داشته باشند. **پروتئین‌های داربستی و آداپتور**[1] با قراردادن فیزیکی چندین پروتئین پیام‌رسان در یک مسیر پیام‌رسانی خاص، سبب افزایش درستی و سرعت یک آبشار پیام‌رسانی پیچیده می‌گردند. پروتئین‌های تحت عنوان **پروتئین‌های لنگری**[2] پروتئین‌های پیام‌رسان محلول را در موقعیت‌های تحت‌سلولی خاصی متمرکز می‌کنند. برای مثال، انواع وسیعی از پروتئین‌های لنگری کیناز **A**-[3] (AKAPs) پروتئین کینازهای تحت تنظیم cAMP (پروتئین کیناز **A**[4]؛ PKA) را در غشاء پلاسمایی، اسکلت سلولی یا در داخل هسته متمرکز می‌کنند. همایش گیرنده‌ها، پروتئین‌های آداپتور، پروتئین‌های افکتور، و سایر اجزاء پیام‌رسانی در داخل کمپلکس‌های پیام‌رسانی، اغلب مستلزم تعامل‌های اختصاصی دومن‌های خاص موجود در داخل این پروتئین‌ها می‌باشد (شکل ۸-۱۳). **دومن‌های SH2**[5] و **دومن‌های PTB**[6] ریشه‌های تیروزین اختصاصی را در انواع مختلفی از پروتئین‌های پیام‌رسانی شناسایی می‌کنند و به آنها اتصال می‌یابند. **دومن‌های SH3**[7] به دومن‌های غنی از پرولین اتصال می‌یابند که مشخصه برخی پروتئین‌های پیام‌رسانی است. **دومن‌های PH**[8] به‌طور اختصاصی برخی فسفولیپیدهای اینوزیتولی را شناسایی می‌کنند و به آنها اتصال می‌یابند که نقش‌های مهمی را به عنوان پیامبرهای دوم لیپیدی یا سوبستراهای لیپیدی برای فسفولیپاز C دارند.

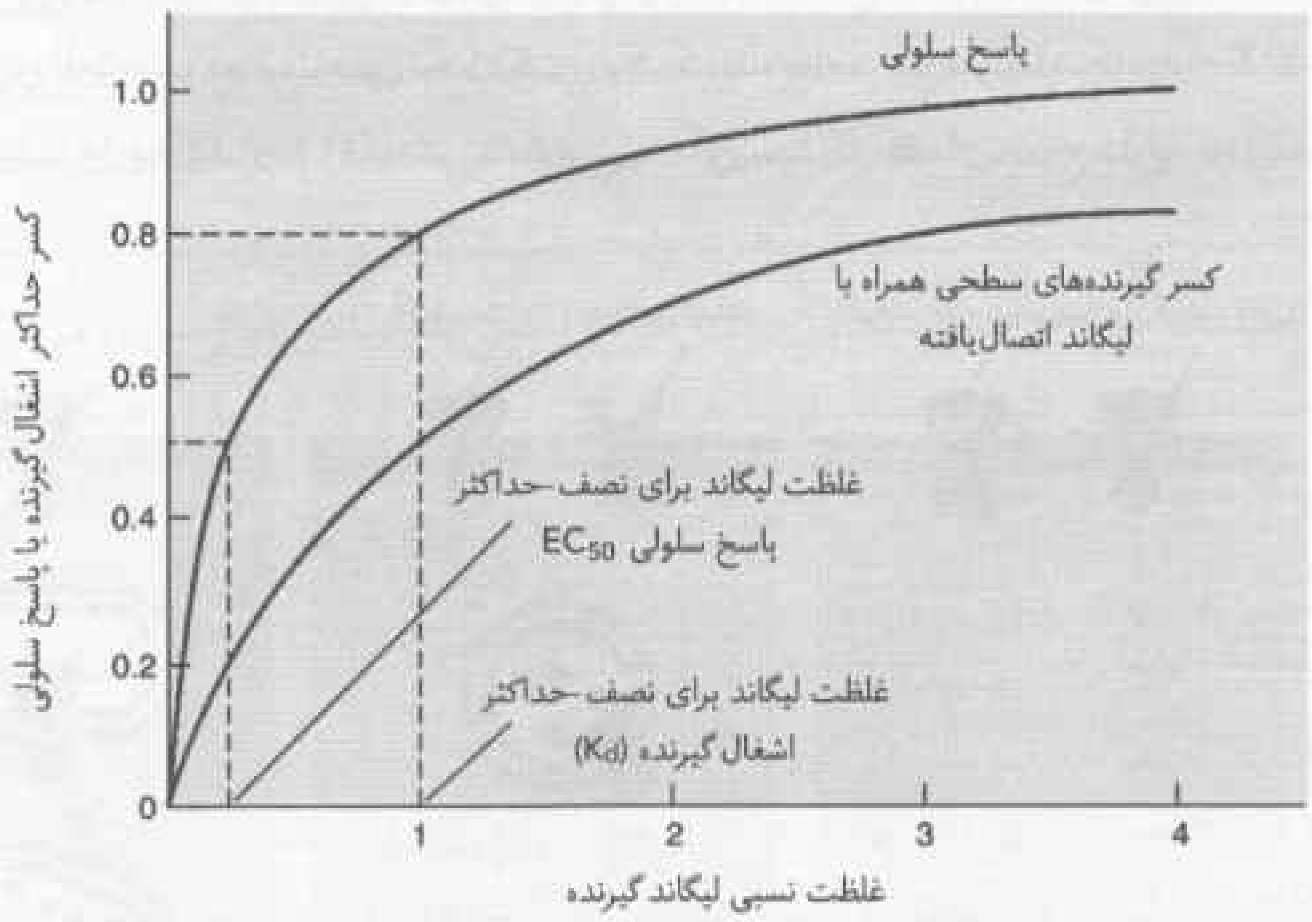
تعامل لیگاند-گیرنده و حوادث پیام‌رسانی فرودست

اتصال یک **لیگاند آگونیست** به یک گیرنده با **تمایل**[9] و **ظرفیت**[10] اتصال به گیرنده مشخص می‌گردد. تمایل نشان‌دهنده ارتباط بین غلظت آگونیست و تولید کمپلکس‌های گیرنده-آگونیست است. تمایل نسبت عکس با **ثابت تفکیک**[11] (K_D) (برحسب مولاریتی لیگاند اندازه‌گیری می‌شود) دارد که کمپلکس آگونیست-گیرنده را مشخص می‌کند (شکل ۹-۱۳). K_D معادل غلظت آگونیست آزادی است که امکان اتصال به ۵۰٪ تعداد کل جایگاه‌های اتصالی را بر روی گیرنده (اشغال نیمه‌اشباع) فراهم می‌سازد. **قدرت**[12] واژه‌ای است که برای اندازه‌گیری تمایل نسبی یک آگونیست برای گیرنده خود مورد استفاده قرار می‌گیرد. آگونیستی که قدرت بالایی دارد، حتی در زمانی‌که غلظت آن بسیار کم است، اتصال می‌یابد (تمایل بالا، K_D پایین). ظرفیت تعامل اشاره به تعداد مطلق جایگاه‌های گیرنده دارد. از آنجایی‌که معمولاً پروتئین‌های گیرنده به میزان نسبتاً کمی در هر سلول بیان می‌شوند، منحنی‌های مربوط به اتصال آگونیست-گیرنده، قابلیت اشباع را نشان می‌دهند. علاوه‌بر اندازه‌گیری

1. Scaffold and adaptor proteins
2. Anchoring proteins
3. A-kinase anchoring proteins
4. Protein kinase A
5. Src-Homology type 2
6. Phosphotyrosine binding
7. Src-Homology type 3
8. Pleckstrin Homology
9. Affinity
10. Capacity
11. Dissociation constaNT
12. Potency



شکل ۸-۱۳ نقش‌های مربوط به پروتئین‌های آداپتور و دومن‌های تعامل پروتئین-پروتئین در همایش کمپلکس‌های پیام‌رسانی داخل‌سلولی.



شکل ۹-۱۳ ارتباط بین K_d، به‌عنوان معیاری از تمایل اتصالی لیگاند-گیرنده، و EC_{50} به‌عنوان معیاری از پاسخ عملکردی به تولید کمپلکس‌های لیگاند-گیرنده.

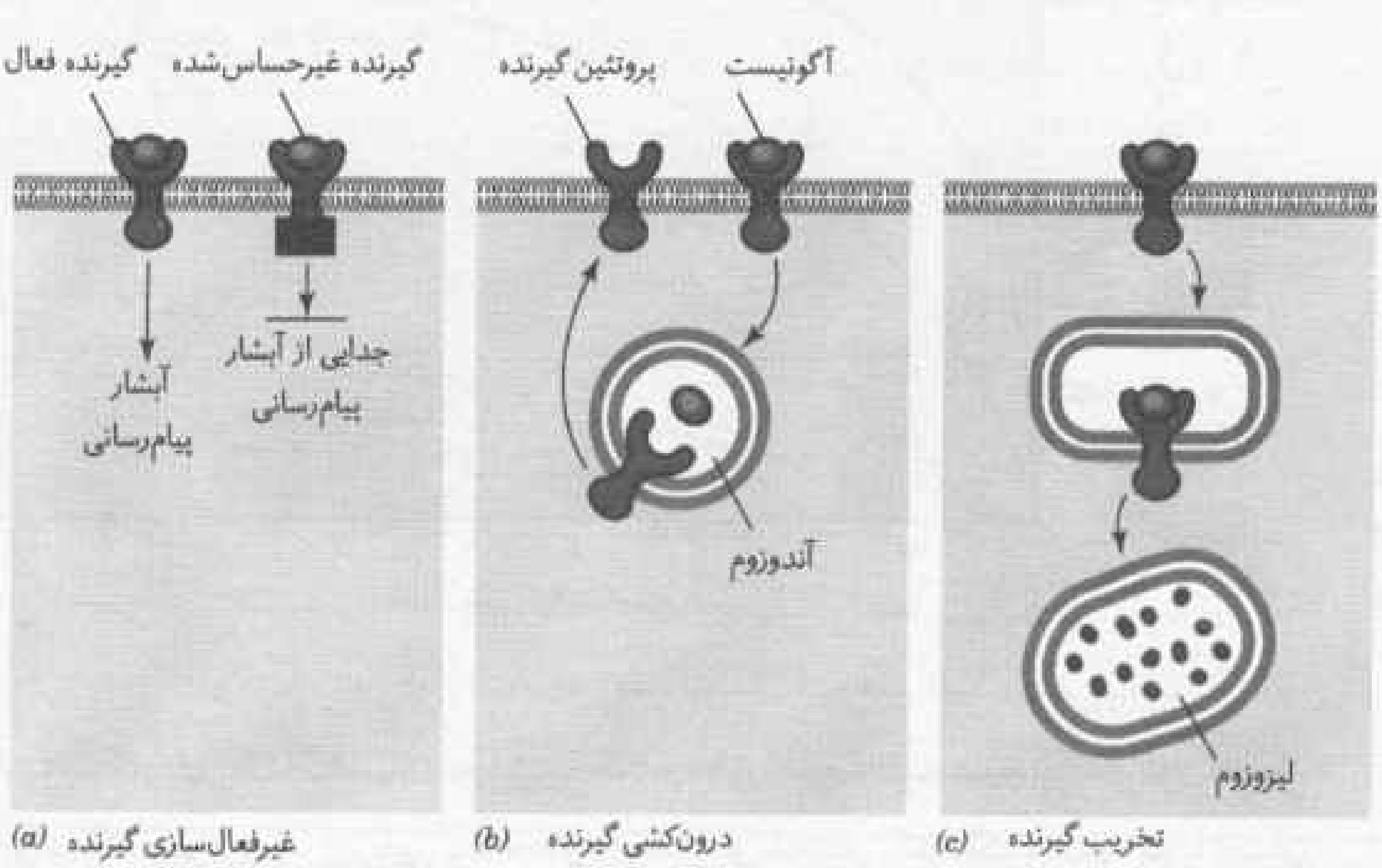
مستقیم اتصال یک آگونیست به گیرنده خود، به‌طور غیرمستقیم همچنین می‌توان تعامل آگونیست-گیرنده را با ارزیابی پاسخ‌های عملکردی مختلفی اندازه‌گیری نمود که با اتصال آگونیست به گیرنده آغاز می‌شوند. به‌طور کلی، بزرگی این پاسخ‌ها متناسب با میزان کمپلکس

گیرنده متصل به آگونیست می‌باشد. **منحنی دوز-پاسخ**[1] ارتباط بین غلظت آگونیست و پاسخ بیولوژیکی را اندازه‌گیری می‌کند.

غلظتی از آگونیست که نصف پاسخ حداکثر را ایجاد می‌کند، غلظت نصف حداکثر تأثیر[2] یا $\mathbf{EC_{50}}$ می‌باشد. این میزان مستقیماً متناسب با K_D کمپلکس آگونیست-گیرنده می‌باشد (شکل ۹-۱۳). هر چند، معمولاً EC_{50} بسیار کوچکتر از K_D است؛ یعنی، غلظت آگونیست مورد نیاز برای نصف حداکثر فعال‌سازی پاسخ بیولوژیکی سلول، کمتر از غلظت آگونیست مورد نیاز برای نصف حداکثر اشغال کل تعداد گیرنده‌های سلول می‌باشد. این به معنی آن است که یک سلول معمولاً گیرنده‌های بیشتری را نسبت به میزان مورد نیاز برای پاسخ‌های بیولوژیکی مؤثر، بیان می‌کند. این گیرنده‌های اضافی، یا چشم‌پوشی‌شده، به سلول امکان پاسخ‌دهی به آگونیست راحتی بعد از غیرفعال‌سازی یا تخریب گیرنده‌هایی را می‌دهد که با اشغال قبلی توسط آگونیست فعال شده‌اند. همان‌طور که در قسمت پایین اشاره خواهد شد، غیرفعال‌سازی یا تخریب گیرنده، نقش مهمی در خاتمه هدایت پیام توسط گیرنده‌ها دارد.

خاتمه هدایت پیام توسط گیرنده‌های سطح سلولی

سلول‌ها مکانیسم‌های متعددی را برای خاتمه یا تضعیف پاسخ‌های خود به هورمون‌ها، نوروترانسمیترها یا مدیاتورهای موضعی مختلف دارند. این مکانیسم‌ها به سلول‌ها اجازه می‌دهند تا به وضعیت پایه قبل از تحریک خود برگردند و مانع فعال‌سازی بیش از حد یا فعال‌سازی نامناسب فعالیت‌های تحت کنترل یک گیرنده خاص می‌شوند (شکل ۱۰-۱۳). این مکانیسم‌ها عبارتند از: (۱) کاهش دسترسی به آگونیست در فضای خارج‌سلولی نزدیک



شکل ۱۰-۱۳ مکانیسم‌های اصلی برای خاتمه تبدیل پیام وابسته به گیرنده.

1. Dose-response curve 2. Half maximal effective concentration

یک سلول هدف، (۲) درون‌کشی[1] و تخریب کمپلکس گیرنده اتصال‌یافته به آگونیست، و (۳) تغییر سریع گیرنده (برای مثال، به طریق فسفریلاسیون) که سبب غیرفعال‌سازی یا حساسیت‌زدایی آن می‌شود.

ساده‌ترین مکانیسم برای خاتمه هدایت پیام، کاهش غلظت خارج‌سلولی آگونیست ترشحی می‌باشد. میزان تأثیر و سرعت این مکانیسم توسط چند عامل تعیین می‌شود: (۱) پایداری آگونیست ترشحی، (۲) اندازه یا ظرفیت بخش خارج‌سلولی که آگونیست به داخل آن ترشح شده است، و (۳) نزدیکی سلول‌های فرستنده به سلول‌های هدف. از طریق کاهش سریع دسترسی به آگونیست، به‌سختی می‌توان پیام‌رسانی آندوکرین را خاتمه داد، زیرا هورمون‌ها به داخل یک محیط خارج‌سلولی با ظرفیت بالا ترشح می‌شوند. برعکس، کاهش سریع قابلیت دسترسی به آگونیست نقش مهمی در خاتمه پیام‌رسانی سیناپسی بازی می‌کند؛ نوروترانسمیترها به‌طور موضعی به داخل یک فضای با ظرفیت بسیار پایین، شکاف سیناپسی، ترشح می‌شوند و سریعاً به خارج این محل انتشار می‌یابند. برخی سلول‌ها همچنین غلظت آگونیست مجاور خود را با جمع‌آوری مجدد آگونیست آزادشده (برای مثال، برداشت مجدد نوروترانسمیترهایی نظیر سروتونین و دوپامین) و یا با متابولیزه‌نمودن آگونیست خارج‌سلولی، کاهش می‌دهند. متابولیسم خارج‌سلولی توسط آنزیم‌های اختصاصی (برای مثال، استیل‌کولین استرازها) موجود در سطح سلول‌های هدف قابل انجام می‌باشد. برخی نوروتوکسین‌ها به عنوان مهارکننده تجزیه نوروترانسمیترها عمل می‌کنند.

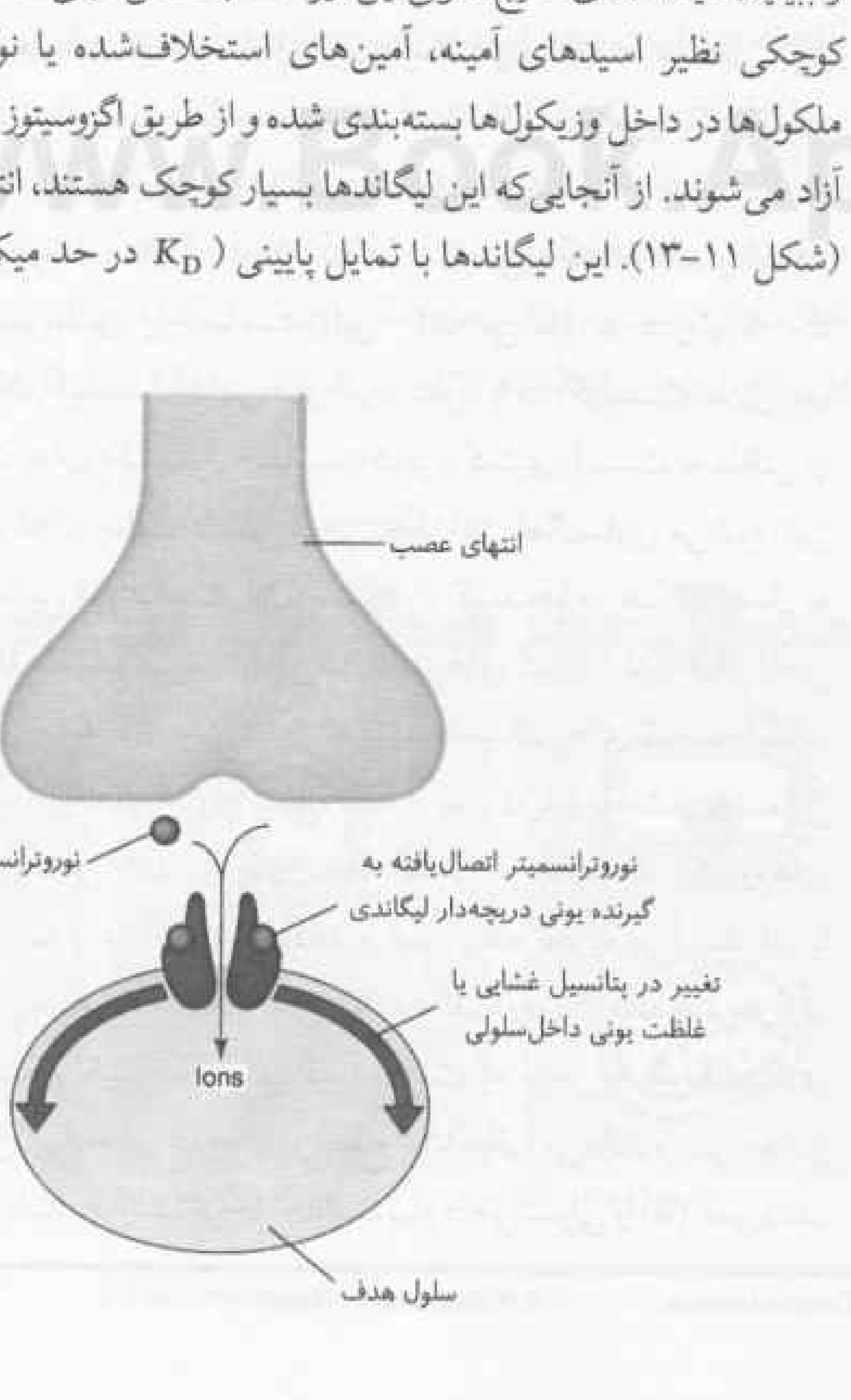
سلول‌ها همچنین می‌توانند هدایت پیام را با تنظیم دسترسی به گیرنده‌های وظیفه‌دار خاتمه دهند که به آن فرایند **تطابق**[2] یا **حساسیت‌زدایی**[3] گفته می‌شود. در صورتی که یک سلول مکرراً در معرض یک آگونیست خاص قرار گیرد، سلول با آن آگونیست تطابق پیدا (عادت) می‌کند. با گذشت زمان، یک سلول حساسیت کمتر و کمتری را نسبت به غلظتی از آگونیست پیدا خواهد کرد که در حالت طبیعی منجر به حداکثر فعال‌سازی می‌شود. این حساسیت‌زدایی نتیجه چندین فرایند است. اول، بسیاری از گیرنده‌ها در هنگام اتصال به لیگاند خود، سریعاً به داخل کشیده می‌شوند. این کمپلکس‌های گیرنده-لیگاند در داخل آندوزوم‌ها قرار گرفته و در ادامه با اسیدی‌شدن آندوزوم، کمپلکس‌های گیرنده-لیگاند تفکیک می‌شوند. برخی آندوزوم‌های حاوی گیرنده فاقد لیگاند دوباره به غشاء پلاسمایی برگشته و در آنجا این گیرنده‌ها می‌توانند دوباره در سطح غشاء قرار داده شوند. آندوزوم‌های دیگر به سمت لیزوزوم‌ها رفته و در آنجا هم لیگاند و هم گیرنده تجزیه می‌شوند. لذا با گذشت زمان، گیرنده کمتری در غشاء سطحی باقی خواهد ماند. دوم، یک مکانیسم سریع‌تر برای حساسیت‌زدایی، مستلزم تغییر ساختمانی گیرنده است که منجر به غیرفعال‌سازی عملکردی[4] آن می‌شود. این گیرنده‌های غیرفعال در سطح غشاء باقی می‌مانند و حتی ممکن است به آگونیست اتصال یابند. هرچند، مراحل هدایت پیام داخل‌سلولی را آغاز نمی‌کنند.

1. Internalization 2. Adaptation 3. Desensitization 4. Functional inactivation

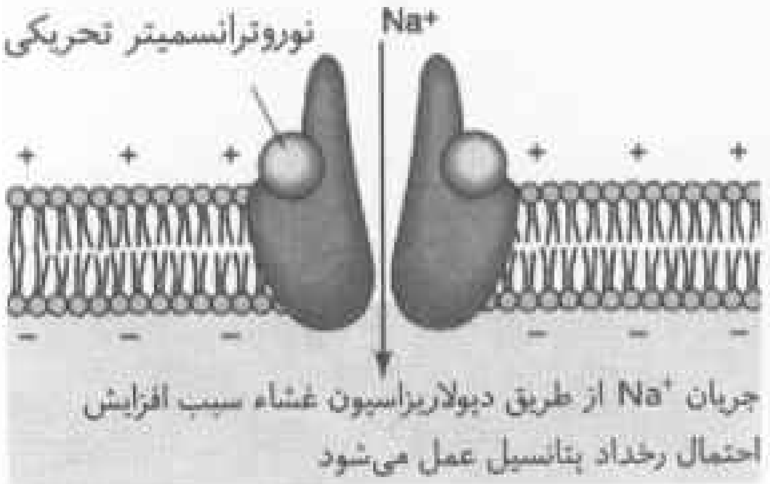
در بسیاری از موارد، غیرفعال‌سازی عملکردی گیرنده ناشی از فسفریلاسیون خود پروتئین گیرنده می‌باشد. لذا در حالی که گیرنده اشغال‌شده توسط آگونیست، آبشاری از حوادث هدایت پیام را آغاز می‌کنند که مستلزم فعال‌سازی پروتئین کینازها می‌باشد، برخی از این پروتئین کینازها خود گیرنده را فسفریله می‌کنند که نتیجه آن غیرفعال‌سازی گیرنده می‌باشد. این نوعی تنظیم پس‌نوردی منفی کلاسیک می‌باشد. برحسب گیرنده، این غیرفعال‌سازی عملکردی می‌تواند به‌طور آهسته یا سریع معکوس شود.

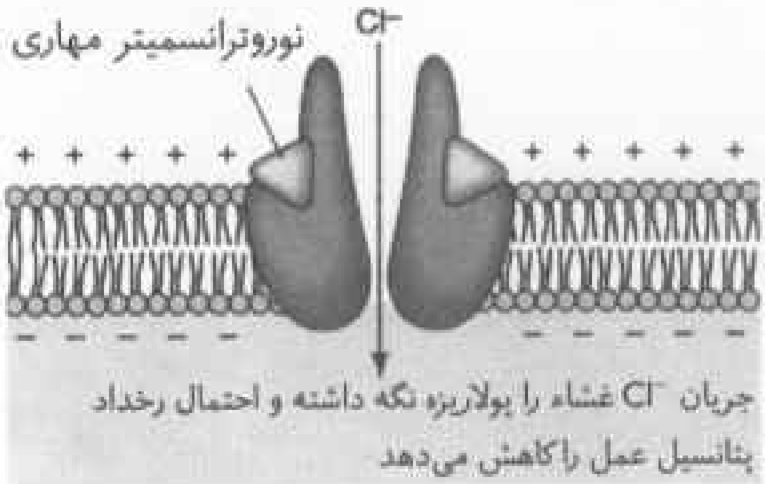
۵-۱۳ • گیرنده‌های کانال یونی دریچه‌دار- لیگاندی

در سیناپس‌های عصب- عصب یا عصب- عضله نیاز به پیام‌رسانی بسیار سریع (ظرف میلی‌ثانیه) می‌باشد. لذا لازم است گیرنده‌های نوروترانسمیتری از طریق حداقل تعداد مراحل آنزیمی سبب ایجاد تغییر در پاسخ‌های سلولی شوند، زیرا برخی واکنش‌های بیوشیمیایی نسبتاً آهسته (ظرف چند ثانیه تا چند دقیقه) هستند. بسیاری (ولی نه تمامی) نوروترانسمیترها به گیرنده‌هایی اتصال می‌یابند که **کانال‌های یونی دریچه‌دار لیگاندی** هستند (شکل a۴-۱۳ را ببینید). لیگاندهای خارج‌سلولی این گیرنده‌ها به شکل ثابتی شامل، ملکول‌های آلی بسیار کوچکی نظیر اسیدهای آمینه، آمین‌های استخلاف‌شده یا نوکلئوتیدها، هستند. این ملکول‌ها در داخل وزیکول‌ها بسته‌بندی شده و از طریق اگزوسیتوز سریع به داخل سیناپس‌ها آزاد می‌شوند. از آنجایی که این لیگاندها بسیار کوچک هستند، انتشار بسیار سریعی دارند (شکل ۱۱-۱۳). این لیگاندها با تمایل پایینی (K_D در حد میکرومولار تا میلی‌مولار) به



شکل ۱۱-۱۳ گیرنده‌های کانال یونی دریچه‌دار نورور-ترانسمیتری به عنوان عناصر اصلی تبدیل پیام در سیناپس‌های عصبی.





شکل ۱۲-۱۳ نوروترانسمیترهای تحریکی در برابر مهاری به‌عنوان آگونیست گیرنده‌های کانال یونی دریچه‌دار لیگاندی.

گیرنده‌های خود اتصال می‌یابند. این موضوع امکان جدایی سریع کمپلکس لیگاند-گیرنده را با کاهش غلظت خارج‌سلولی نوروترانسمیتر فراهم می‌سازد.

اتصال نوروترانسمیتر به جایگاه‌های خارج سلولی اتصال به لیگاند این گیرنده‌ها یک تغییر تقریباً لحظه‌ای را در کونفورماسیون گیرنده به‌وجود می‌آورد که امکان نفوذ یون‌ها از میان کمپلکس پروتئینی گیرنده را فراهم می‌سازد. این جریان یون‌ها سریعاً تغییراتی را در پتانسیل غشاء سلول به‌وجود می‌آورد. در صورتی‌که یک کاتیون نظیر Na^+ از میان کانال گیرنده عبور کند، سلول دپولاریزه می‌شود؛ در صورتی‌که آنیونی نظیر Cl^- اجازه عبور پیدا کند، سلول هیپرپولاریزه خواهد شد (شکل ۱۲-۱۳). گیرنده‌های انتخابی-کاتیونی توسط **نوروترانسمیترهای تحریکی** (استیل‌کولین، گلوتامات، سروتونین و ATP) و گیرنده‌های انتخابی- آنیونی توسط **نوروترانسمیترهای مهاری** (اسید γ-آمینو بوتیریک [GABA] و گلیسین) باز می‌شوند. فعال‌سازی این کانال‌های یونی دریچه‌دار نوروترانسمیتری سبب ایجاد تغییراتی در پتانسیل غشایی می‌شود که نتیجه آن تنظیم ثانویه (فعال‌سازی یا مهار) بسیاری از انواع کانال‌های دریچه‌دار ولتاژی، شامل کانال‌های دریچه‌دار ولتاژی مربوط به Ca^{2+}، می‌باشند. تغییر در فعالیت این کانال‌ها سبب تغییر غلظت سیتوزولی Ca^{2+} می‌شود که یک پیامبر دوم کلیدی است. به نوبه خود، افزایش Ca^{2+} سیتوزولی، پاسخ‌های حاد، نظیر آزادسازی اگزوسیتیک وزیکول‌های حاوی نوروترانسمیتر از نورون‌ها یا انقباض سلول‌های عضلانی، یا پاسخ‌های طولانی-مدت، نظیر فعال‌سازی بیان ژنی حساس به Ca^{2+}، را در سلول‌های هدف به همراه دارد. اکثر نوروترانسمیترهایی که گیرنده‌های کانال یونی دریچه‌دار لیگاندی را فعال می‌کنند، همچنین می‌توانند با زیرنوع‌های گیرنده‌ای دیگر تعامل کنند که گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G هستند. بر همین اساس، استیل-کولین دو نوع گیرنده دارد، یکی **گیرنده نیکوتینی**[1] (نامگذاری به دلیل اتصال داروی نیکوتین به این گیرنده) که از نوع کانال‌های دریچه‌دار لیگاندی است، و دیگری **گیرنده موسکارینی**[2] (نامگذاری به دلیل اتصال موسکارین به این گیرنده) که با پروتئین G جفت می‌شود.

گیرنده‌های کانال یونی

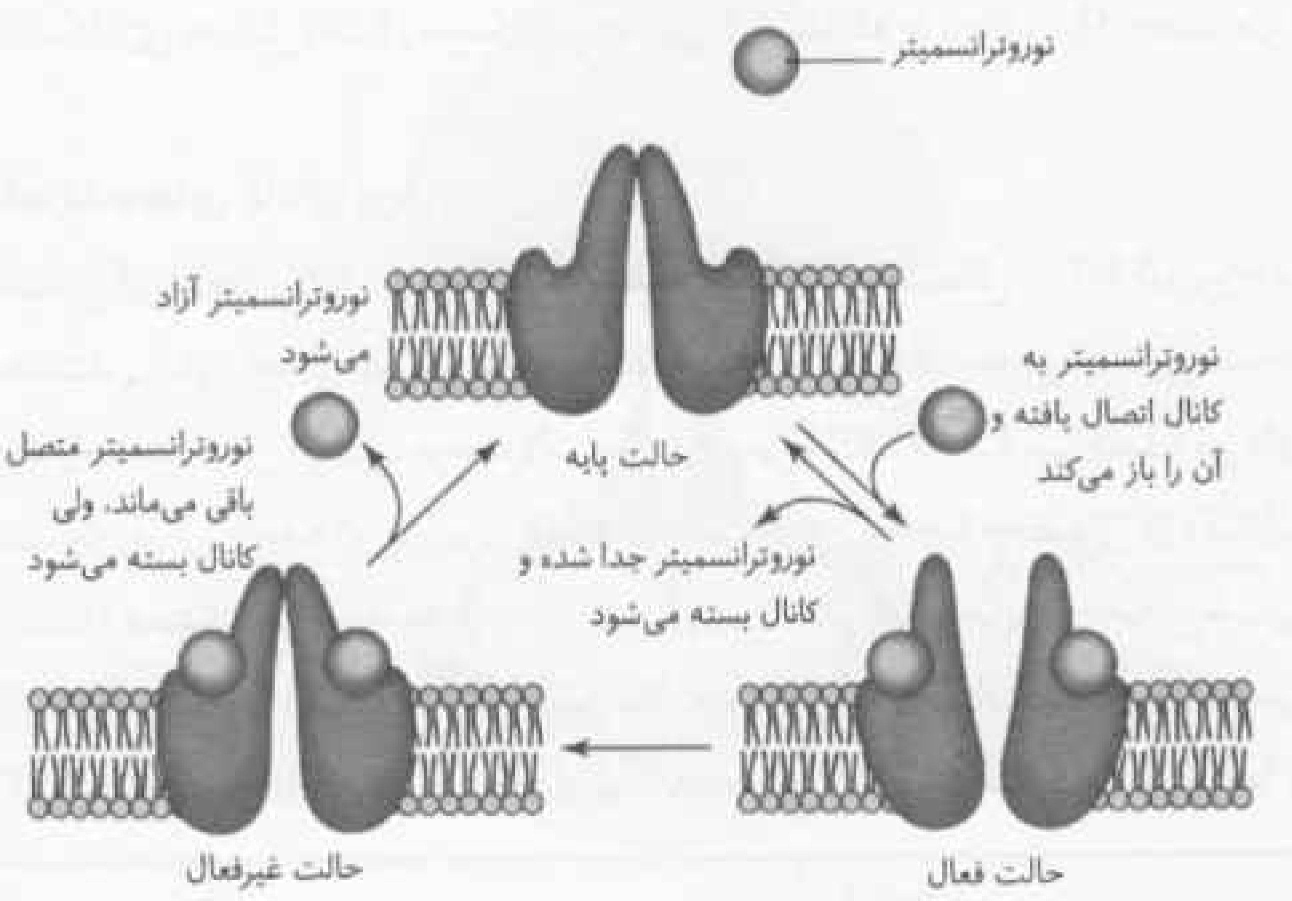
تمامی گیرنده‌های کانال یونی، کمپلکس‌هایی اولیگومری متشکل از ۳ تا ۵ زیرواحد پروتئینی هستند. برخی از آنها کمپلکس‌های هُمومریک هستند که حاوی چندین نسخه از یک زیرواحد پروتئینی (یعنی، محصولات یک ژن) می‌باشند. موارد دیگر کمپلکس‌های هترومر متشکل از زیرواحدهای پروتئینی مختلف (یعنی، هر زیرواحد محصولی از یک ژن متفاوت است) هستند. هر زیرواحد یک پروتئین درون غشایی با دومن‌های عرض‌غشایی متعدد است. **گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین** مثال خوبی از خصوصیات ساختمانی مهمی هستند که گیرنده‌های کانال یونی دریچه‌دار لیگاندی را مشخص می‌کنند. این گیرنده‌ها کمپلکس

1. Nicotinic receptor   2. Muscarinic receptor

پنتامری از زیرواحدها می‌باشند که هر زیرواحد آن یک انتهای آمینو و کربوکسیل خارج‌سلولی به همراه چهار دومن پل‌زننده بر روی غشاء (M1، M2، M3 و M4) دارد. پنج دومن M2 که هر کدام از آنها مربوط به یک زیرواحد می‌باشد، در مجاورت یکدیگر یک منفذ هدایت‌کننده یون را به‌وجود می‌آورند. اتصال نوروترانسمیتر به جایگاه‌های خارج‌سلولی موجود در کمپلکس گیرنده سبب نوآرایی بسیار کوچک و ظریف در نحوه تراکم دومن‌های M2 با یکدیگر می‌شود. این نوآرایی تقریباً لحظه‌ای سبب برداشت سدهای انرژی در برابر جریان یونی از میان منفذ پوشیده از آب می‌شود. در این وضعیت، گیرنده به لیگاند متصل بوده و فعال است. هرچند، این وضعیت فعال کانال‌های گیرنده متصل به لیگاند تنها برای چند ثانیه یا چند دقیقه (برحسب انواع مختلف کانال‌های گیرنده دریچه‌دار لیگاندی) *پایدار می‌ماند تا اینکه نوآرایی دوم در زیرواحدها رخ دهد.* این تغییر سبب می‌شود تا حتی با ادامه اتصال نوروترانسمیتر، کانال دوباره یک کونفورماسیون غیرهدایت‌کننده را کسب کند (یعنی، گیرنده متصل به لیگاند است، ولی غیرفعال می‌باشد). این غیرفعال‌سازی سریع یک شکل غیرکووالان حساسیت‌زدایی گیرنده است (شکل ۱۳-۱۳). فعال‌سازی مجدد کانال گیرنده تنها بعد از جداشدن نوروترانسمیتر از جایگاه‌های اتصالی خارج‌سلولی رخ می‌دهد. لذا این گیرنده‌ها بین سه وضعیت عملکردی اصلی (عدم وجود لیگاند/غیرفعال >اتصال لیگاند/ فعال > اتصال لیگاند/غیرفعال) در حال چرخش می‌باشند.

خاتمه پیام‌رسانی توسط گیرنده‌های کانال یونی

چندین مکانیسم برای خاتمه پیام‌رسانی توسط گیرنده‌های کانال یونی وجود دارد. اول، لیگاندهای مربوط به این گیرنده‌ها به شکل بسیار موقتی به داخل فضاهای خارج‌سلولی مشخص بسیار کوچک (برای مثال، سیناپس) ترشح می‌شوند که امکان انتشار سریع



شکل ۱۳-۱۳ تغییرات کونفورماسیونی در کانال‌های یونی دریچه‌دار- لیگاندی طی فعال‌سازی و غیرفعال‌سازی عملکرد گیرنده.

نوروترانسمیتر و دوری آن از گیرنده را فراهم می‌سازد. دوم، غلظت خارج‌سلولی نوروترانسمیتر با تجزیه سریع توسط آنزیم‌های (مثلاً استیل‌کولین استراز) موجود در سطح خارجی غشاء پلاسمایی یا با برداشت مجدد سریع به داخل نورون ترشح‌کننده، کاهش می‌یابد. بالاخره، تولید وضعیت متصل به لیگاند غیرفعال تضمین می‌نماید که دوره هدایت پیام توسط این گیرنده‌های نوروترانسمیتری بسیار کوتاه باشد.

با وجود اینکه برقراری سریع جریان یونی جزء فعالیت‌های مستقیم این گیرنده‌ها است، ولی این گیرنده‌ها با تعداد زیادی از پروتئین‌های سلولی دیگر نیز در ارتباط هستند. برخی از این پروتئین‌های مرتبط به‌عنوان پروتئین‌های آداپتور عمل کرده و سبب تجمع مؤثر این گیرنده‌ها همراه با پروتئین‌های پیام‌رسان فرودست دیگر در یک محل می‌شوند. این عوامل در دومن‌های تحت‌سلولی خاصی، نظیر غشاء پلاسمایی در محل تماس‌های سیناپسی، تولید **کمپلکس‌های پیام‌رسانی** متمرکز می‌کنند. برای مثال، دم انتهای کربوکسیل داخل‌سلولی گیرنده کانال یونی دریچه‌دار گلوتاماتی در محل تراکم **پس‌سیناپسی**[1] در زیر محل تماس سیناپسی، به یک **پروتئین آداپتور** تحت عنوان PSD-95 می‌پیوندد. این تعامل توسط یک دومن موجود بر روی PSD-95 تحت عنوان دومن PDZ تسهیل می‌گردد (PDZ مخففی برای ترکیبی از سه پروتئین PSD95، DlgA[2] و Zo-1[3] می‌باشد که برای اولین اشتراک این دومن در آنها مشخص شد). PSD-95 چندین دومن PDZ (علاوه‌بر جایگاه PDZ اختصاصی که به کانال‌های دریچه‌دار گلوتاماتی اتصال می‌یابد) دارد که امکان قرارگیری این گیرنده در کنار کینازها، فسفاتازها و پروتئین‌های اسکلت سلولی مختلف را فراهم می‌سازد.

سایر پروتئین‌هایی که به کانال‌های دریچه‌دار نوروترانسمیتری می‌پیوندند، به‌عنوان چاپرون عمل می‌کنند تا تعیین موقعیت و تجمع این گیرنده‌ها در غشاء سیناپسی را تضمین کنند. برای مثال، گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین از طریق تعامل فیزیکی خود با پروتئین راپسین[4] به‌شدت در سیناپس عصبی-عضلانی متمرکز می‌شوند؛ راپسین یک پروتئین مرتبط با غشاء ۴۳ kDa است که به‌طورمحکم به دومن داخل‌سلولی گیرنده‌های نیکوتینی متصل می‌باشد. وقتی راپسین در موش‌های خانگی ناتوان می‌شود، گیرنده‌های نیکوتینی به شکل مناسبی در محل اتصال عصبی-عضلانی متمرکز نشده و این موضوع سبب میاستنی[5] یا ضعف عضلانی می‌شود.

لیگاندهای دیگر مربوط به گیرنده‌های کانال یونی

گیرنده‌های دیگری غیر از کانال‌های یونی دریچه‌دار نوروترانسمیتری، از کانال‌های یونی برای هدایت داخل‌سلولی پیام استفاده می‌کنند. فعال‌سازی برخی از انواع کانال‌ها از طریق

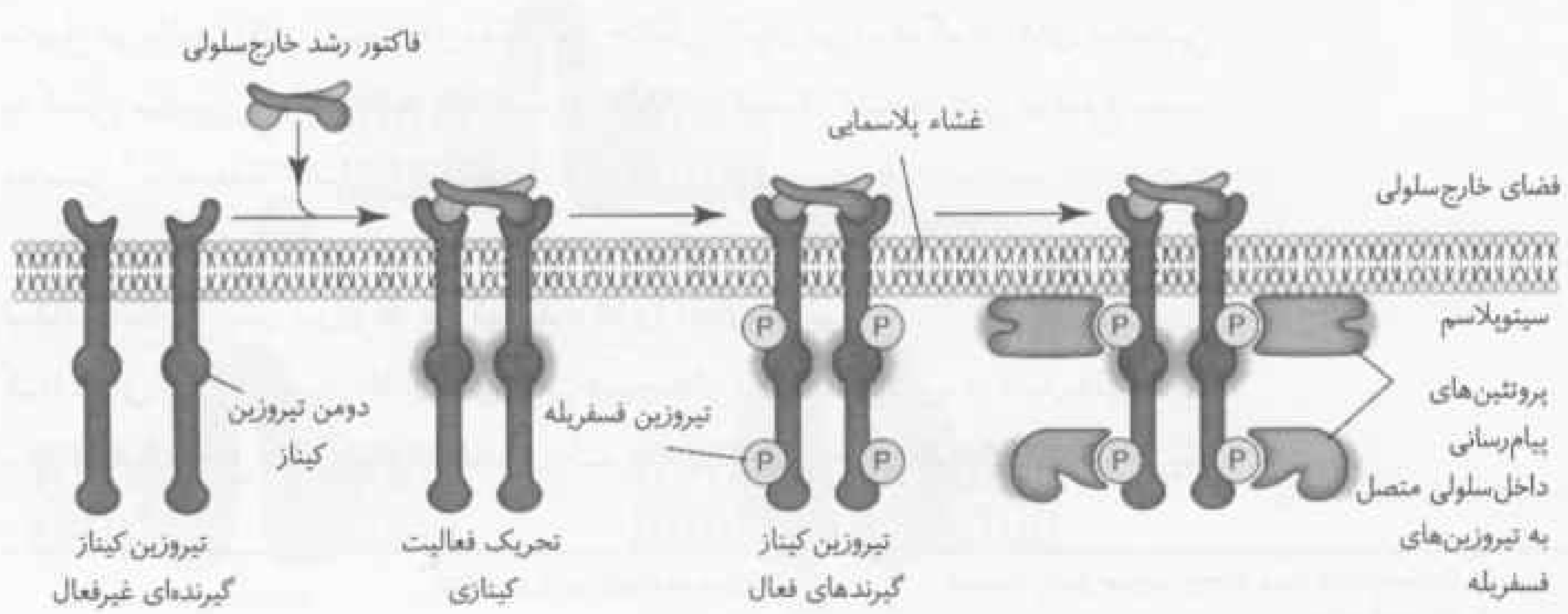
1. Post-synaptic density
2. Drosophila disc large tumor suppressor
3. Zonula occludens-1 protein
4. Rapsyn
5. Myasthenia

تعامل مستقیم پروتئین-پروتئین با زیرواحدهای مربوط به پروتئین‌های G تریمری فعال‌شده می‌باشد که به نوبه خود زمانی فعال می‌شوند که گیرنده‌های جفت‌شونده با پروتئین G فرادست توسط لیگاندهای آگونیستی فعال گردند. انواع دیگر کانال‌های یونی با اتصال لیگاندهای پیامبر دوم داخل‌سلولی نظیر cAMP، cGMP، یا Ca^{2+} فعال می‌شوند. این پیامبرهای دوم با فعال‌سازی بسیاری از انواع گیرنده‌های سطح سلولی، شامل گیرنده‌های جفت‌شونده با پروتئین G، گیرنده‌های کاتالیتیک برای برخی فاکتورهای رشد، و برخی گیرنده‌های سیتوکینی، تجمع می‌یابند. لذا این کانال‌های یونی دریچه‌دار لیگاندی به‌طور غیرمستقیم توسط گیرنده‌های سطح سلولی تنظیم می‌شوند. کانال‌های Ca^{2+} کانال‌های یونی دریچه‌دار وابسته به پیامبر دوم بسیار مهمی هستند که در شبکه آندوپلاسمی قرار دارند. بالاخره، فعالیت کانال‌های یونی دیگر می‌تواند با فسفریلاسیون توسط پروتئین کینازهای مختلف تحت تنظیم پیامبرهای دوم، افزایش (یا کاهش) یابد. این مثال دیگری از تنظیم غیرمستقیم عملکرد کانال توسط گیرنده‌های سطح سلولی می‌باشد.

۶-۱۳ • گیرنده‌های مرتبط با آنزیم گیرنده‌های مرتبط با آنزیم

نقش‌های فیزیولوژیکی و لیگاندهای خارج سلولی

گیرنده‌های مربوط به بسیاری از هورمون‌ها و فاکتورهای رشد پلی‌پپتیدی از انواع پروتئین‌های عرض‌غشایی هستند که فعالیت کاتالیتیکی ذاتی دارند (شکل ۱۴-۱۳). **گیرنده‌های مرتبط با آنزیم** یا **کاتالیتیکی** این فوق‌خانواده پروتئین‌ها به‌واسطه خصوصیات ساختمانی اصلی متعددی شناخته می‌شوند. دومن‌های داخل‌سلولی این گیرنده‌ها فعالیت پروتئین کینازی، پروتئین فسفاتازی، پروتئازی، یا نوکلئوتید فسفودی‌استرازی دارند. این گیرنده‌ها اساساً عملکردهای طولانی-مدت سلولی را در یک مقیاس زمانی چند دقیقه تا چند ساعت، از طریق فعال‌سازی آبشارهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی تنظیم می‌کنند که منجر به فعال‌سازی یا مهار بیان ژن می‌شوند. به نوبه خود، این تغییرات در بیان ژن‌ها، بسیاری از مسیرهای



شکل ۱۴-۱۳
تغییرات کونفورماسیونی و عملکردی در یک تیروزین کیناز گیرنده‌ای طی فعال‌سازی با اتصال فاکتور رشد.

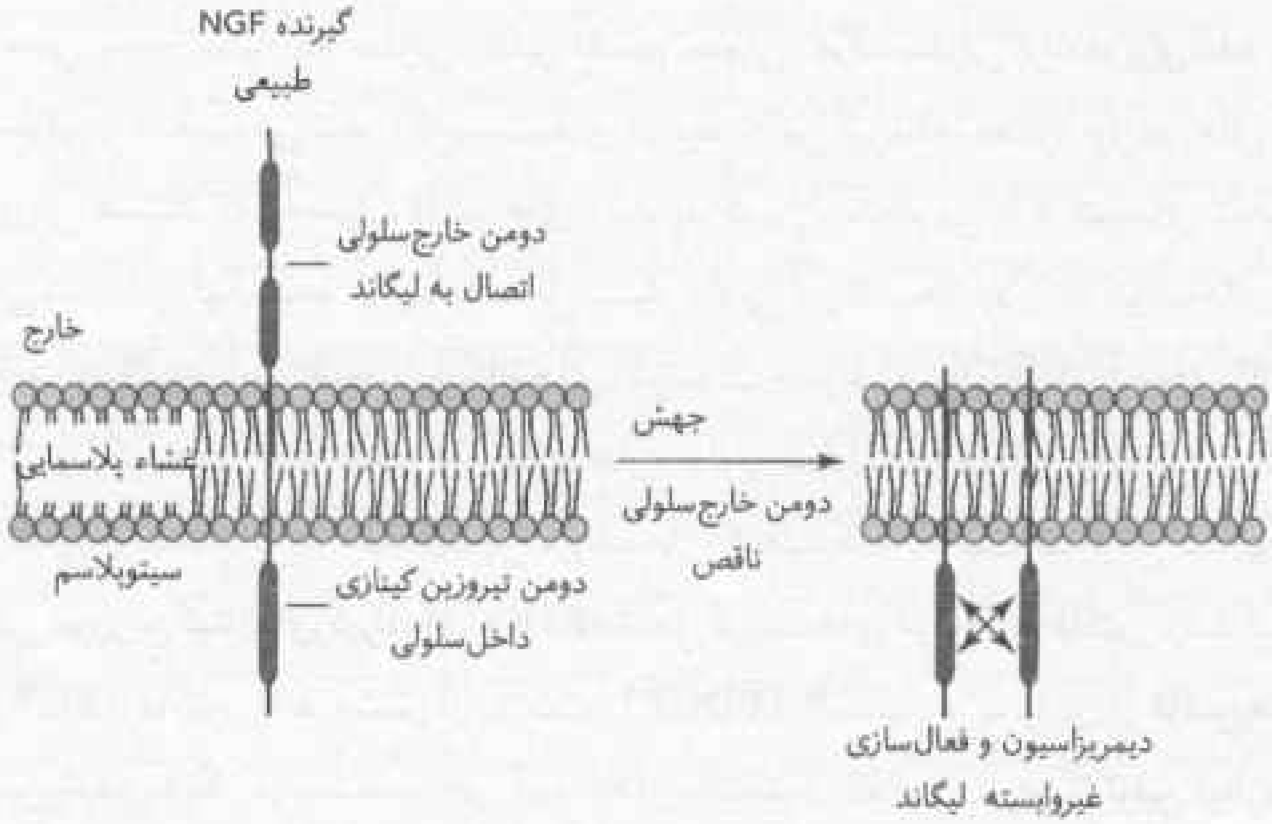
اصلی پاسخ یکپارچه سلولی، نظیر **تقسیم سلولی**، **مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده** یا **تمایز سلولی** را هدایت می‌کنند. آگونیست‌های مربوط به این گیرنده‌ها معمولاً پروتئین‌های ترشحی بزرگی هستند که به‌عنوان فاکتورهای رشد پاراکرین/آندوکرین یا فاکتورهای تمایز عمل می‌کنند. این لیگاندها عموماً با تمایل بسیار بالایی (K_D پیکومولار) به گیرنده‌های مربوطه خود اتصال می‌یابند. هرچند، لیگاندهای آگونیست مربوط به برخی از گیرنده‌های کاتالیتیک، ماکروملکول‌هایی هستند که در سطوح خارج‌سلولی سلول‌های مجاور بیان می‌شوند. (پیام‌رسانی ژوکستاکرین). معمول‌ترین گیرنده‌های کاتالیتیک، فعالیت تیروزین کینازی دارند. این **تیروزین کینازهای گیرنده‌ای**[1] (RTK) شامل گیرنده‌های مربوط به فاکتور رشد اپیدرمی[2] (EGF)، فاکتور رشد مشتق از پلاکت[3] (PDGF)، انسولین و بسیاری از **فاکتورهای رشد** پلی‌پپتیدی دیگر می‌باشند. برخی گیرنده‌های کاتالیتیک فعالیت **سرین/ترئونین کینازی** دارند. بالاخره، برخی هورمون‌ها که در تنظیم فشار خون نقش دارند، به گیرنده‌هایی با فعالیت **گوانیلات سیکلازی** اتصال می‌یابند (شکل ۳۳-۲۲ را ببینید).

تیروزین کینازهای گیرنده‌ای (RTK)

اکثر RTKها گیرنده‌های تک زیرواحدی هستند، ولی برخی از آنها (همانند گیرنده انسولین) به‌صورت کمپلکس‌های مولتیمری وجود دارند (شکل ۲۹-۲۲ را ببینید). هر منومر یک دومن پل‌زننده عرض‌غشایی[4] (TM) دارد که متشکل از ۲۸-۲۵ اسید آمینه است. انتهای آمینوی این گیرنده‌ها از نوع خارج‌سلولی بوده و متشکل از یک دومن بسیار بزرگ برای اتصال هورمون یا فاکتور رشد می‌باشد. انتهای کربوکسیل در داخل سلول قرار داشته و حاوی دومن‌هایی است که مسئولیت فعالیت‌های کاتالیتیکی گیرنده‌ها را بر عهده دارند.

وقتی یک فاکتور رشد به دومن خارج‌سلولی یک RTK اتصال می‌یابد، دیمریزاسیون با زیرواحدهای RTK مجاور را آغاز می‌کنند (شکل ۴-۱۳)؛ این دیمریزاسیون سبب فعال‌سازی سریع دومن کینازی سیتوپلاسمی می‌شود. اولین سوبسترای پروتئینی برای این تیروزین کیناز فعال‌شده، خود گیرنده است؛ دومن داخل‌سلولی گیرنده بر روی چند ریشه تیروزین اتوفسفریله می‌شود. سپس این ریشه‌های تیروزین فسفریله به‌عنوان جایگاه‌های شناسایی یا لنگراندازی برای پروتئین‌هایی عمل می‌کنند که سوبستراهای RTK هستند. این سوبستراهای پروتئینی معمولاً حاوی یک دومن تعامل پروتئین-پروتئین نوع SH2 هستند که تیروزین‌های فسفریله را بر روی گیرنده شناسایی می‌کنند. بدین‌ترتیب امکان اتصال محکم به گیرنده و فسفریلاسیون بعدی ریشه‌های تیروزین موجود در پروتئین‌های سوبسترا فراهم می‌گردد. لذا فعال‌سازی RTK منجر به تجمع انواع متعددی از پروتئین‌ها با تیروزین فسفریله می‌شود. این سوبستراهای «فرودست» به‌عنوان افکتورهایی برای RTK عمل می‌کنند و شامل پروتئین‌های پیام‌رسانی نظیر پروتئین کینازهای دیگر، تنظیم‌کننده‌های

1. Receptor tyrosine kinase 2. Epidermal growth factor 3. Platelet-derived growth factor 4. Transmembrane



شکل ۱۵-۱۳ اشکال جهش‌یافته تیروزین کینازهای گیرنده‌ای به‌عنوان محصولات مربوط به اونکوژن‌های ایجادکننده- سرطان.

GTPaseهای کوچک و آنزیم‌های تغییردهنده سنتز و تجزیه فسفولیپیدها می‌باشند. وقتی این افکتورهای پروتئینی بر روی ریشه‌های تیروزین خود فسفریله شدند، به رابط‌های فعالی در آبشارهای پیام‌رسانی تبدیل می‌شوند که نهایتاً منجر به تغییراتی در موقعیت و فعالیت عملکردی فاکتورهای رونویسی یا پروتئین‌های دیگری می‌شوند که در تقسیم و تمایز سلولی نقش دارند.

جهش در برخی ژن‌های RTK سبب بیان گیرنده‌هایی می‌شود که بدون اتصال فاکتور رشد، کونفورماسیون‌های فعال را اتخاذ می‌کنند (شکل ۱۵-۱۳). ژن‌های جهش‌یافته RTK می‌توانند به‌عنوان **اونکوژن** عمل کنند (جدول ۲-۲۴ را ببینید) که در شروع یا پیشرفت سرطان همکاری دارند (ارتباط بالینی ۱-۱۳).

دیمریزاسیون گیرنده همچنین سبب آغاز درون‌کشی آندوسیتیک کمپلکس فاکتور رشد-RTK می‌شود. با اسیدی‌شدن این آندوزوم‌ها، فاکتور رشد از گیرنده جدا شده و توسط لیزوزوم‌ها تجزیه می‌شود. با وجود اینکه برخی از گیرنده‌هایی که به داخل سلول کشانده شده‌اند نیز تخریب می‌گردند، اکثر آنها دوباره به غشاء پلاسمایی برمی‌گردند. این درون‌کشی کمپلکس گیرنده-لیگاند و به‌دنبال آن جدایی لیگاند، مکانیسم اصلی برای خاتمه هدایت پیام توسط این گیرنده‌ها می‌باشد.

Ras GTPase و MAP کیناز

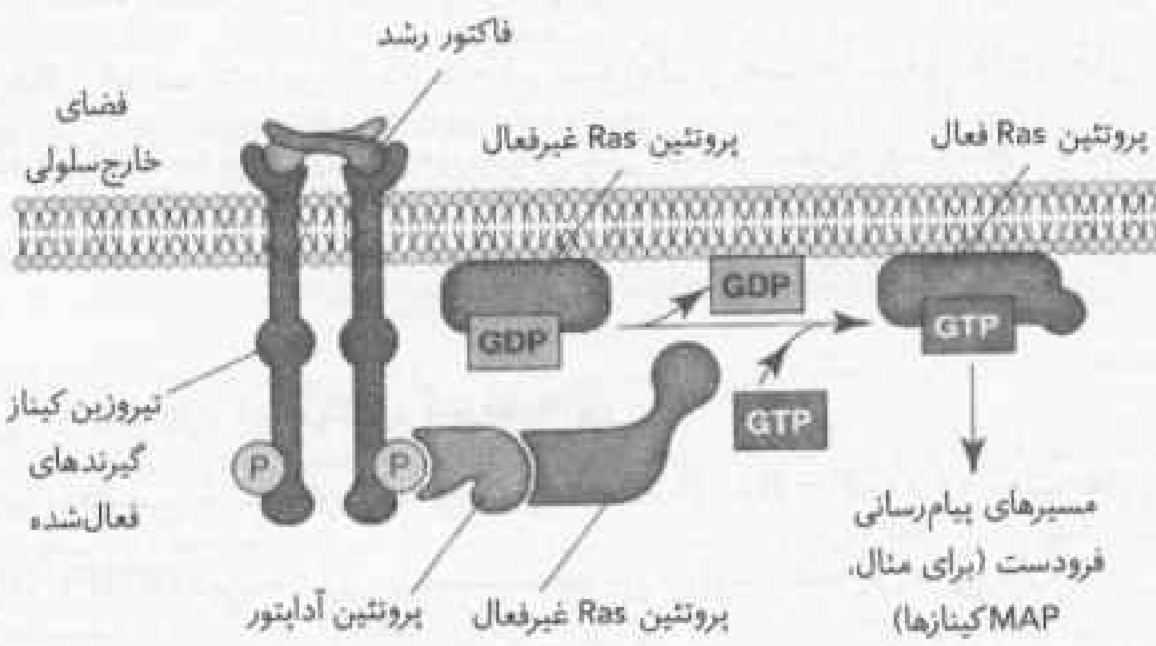
Ras یک GTPase کوچک یا پروتئین تنظیمی اتصال به GTP منومری است که تنظیم‌کننده مهمی برای تکثیر سلولی می‌باشد. حدود ۳۰٪ تومورهای انسانی شامل سلول‌هایی هستند که **اونکوژن‌های Ras**-جهش‌یافته را بیان می‌کنند. پروتئین‌هایی که مستقیماً به جایگاه‌های فسفو-تیروزینی یک RTK فعال‌شده اتصال می‌یابند، شامل ملکول‌های آداپتوری هستند که پروتئین‌های فعال‌کننده Ras را فراخوانده و تحریک می‌کنند (شکل ۱۶-۱۳). این پروتئین‌های تحریک‌شده فعال‌کننده-Ras به‌عنوان GEF سبب تسریع در تعویض GDP با GTP بر

ارتباط بالینی ۱-۱۳

تیروزین کینازهای گیرنده ErbB/HER به عنوان اهدافی برای شیمی درمانی

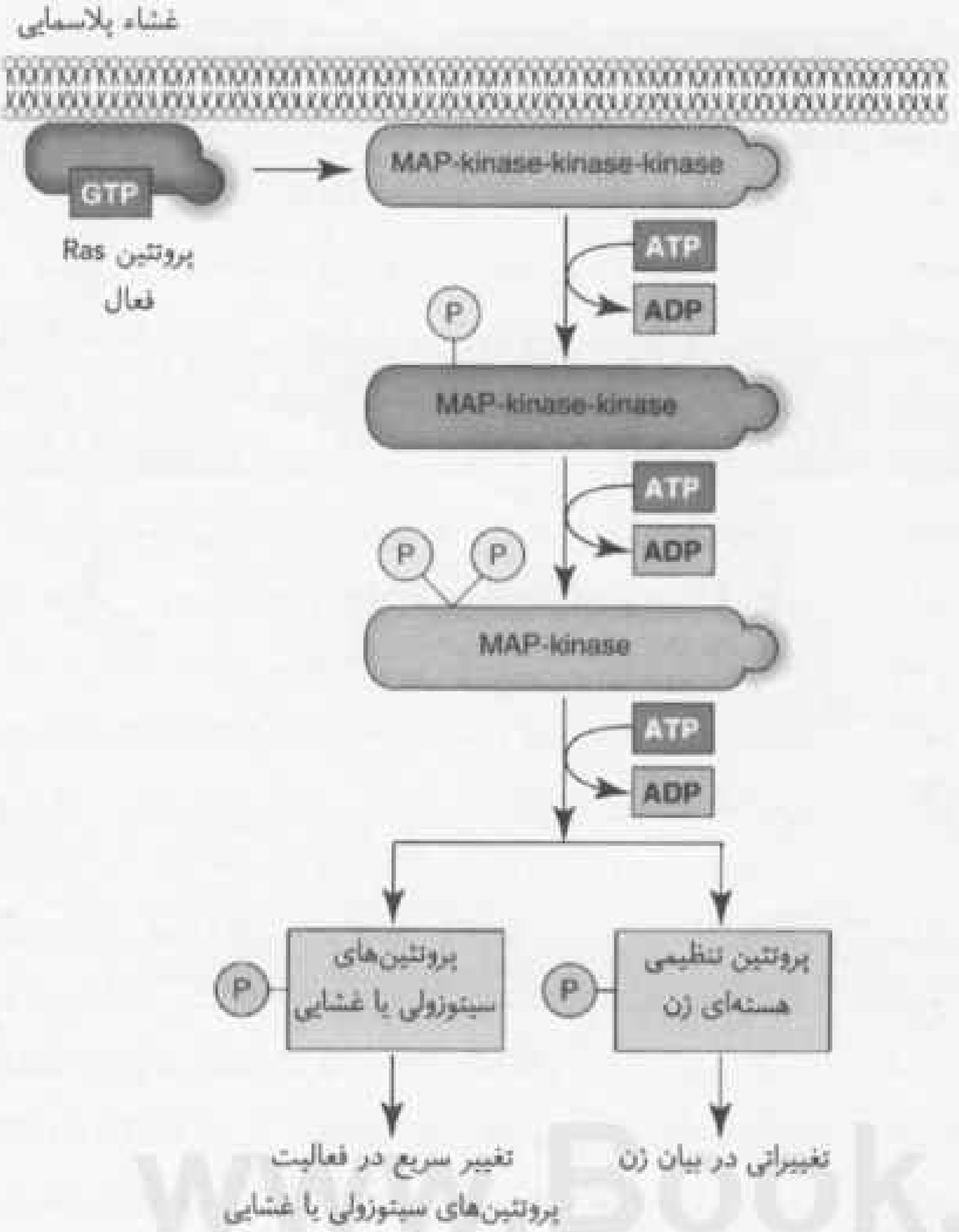
گیرنده‌های متعلق به‌خانواده ErbB/HER با بسیاری از انواع متنوع سرطان‌های انسانی مرتبط هستند. بیان بیش از حد ژن ErbB1 که گیرنده EGF (HER1) را کد می‌کند، در سرطان‌های مثانه، پستان، کلیه، پروستات و ریه غیرسلول کوچک[1] شایع است. یک ژن جهش‌یافته ErbB1 تولید گیرنده‌ای می‌کند که فاقد دومن اتصالی EGF در خارج سلول است و به شدت در گلیوبلاستوم‌هایی بیان می‌شود که ۲۵٪ تومورهای مغز را در انسان بالغ شامل می‌شود. ErbB3 و ErbB4 انسانی گیرنده‌های HER3 و HER4 را کد می‌کنند که به پروتئین‌های خارج‌سلولی خانواده NRG (neuregulin/heregulin/neu) فاکتورهای رشد و تمایز متصل می‌شوند. ErbB3 اغلب در سرطان‌های پستان، کولون، پروستات، و معده افزایش بیان را دارد، در حالی‌که افزایش بیان ErbB4 در تومورهای مربوط به سلول‌های گرانولوزای تخمدان رخ می‌دهد. ErbB2 پروتئین HER2 را کد می‌کند که به هیچ فاکتور رشد خارج‌سلولی شناخته‌شده‌ای اتصال نمی‌یابد. هرچند، HER2 می‌تواند هُمودیمرها یا هترودیمرهایی را با گیرنده‌های HER1، HER3 یا HER4 متصل به فاکتور رشد به‌وجود آورد. از آنجایی که دیمریزاسیون فعالیت تیروزین کینازی ذاتی این پروتئین را فعال می‌کند، حتی افزایش خفیف در HER2 می‌تواند تنظیم رشد طبیعی سلول را تغییر دهد. به شکل قابل‌توجهی، بیان ژن ErbB2 در ۲۰٪ تا ۳۰٪ افراد مبتلا به سرطان پستان مهاجم تا یک صد برابر افزایش می‌یابد. بیان نامناسب ژن‌های ErbB/HER در سرطان‌های انسانی متعدد، ابداع داروهای درمانی متعددی را سرعت بخشیده است که بر علیه این گیرنده‌ها می‌باشند. یکی از این گروه‌های دارویی شامل آنتی‌بادی‌های منوکلونالی هستند که به دومن‌های خارج‌سلولی زیرنوع‌های مختلف ER اتصال می‌یابند که عملکرد قابل‌توجهی دارند. از تراستوزوماب[2]، یک آنتی‌بادی ضد HER2، در درمان سرطان‌های پستانی استفاده شده است که با افزایش بیان ErbB2/HER2 مشخص می‌شوند. مکانیسم عمل این دارو مستلزم فراخوانی فاکتورهای ایمنی برای کشتن سلول‌های توموری و همچنین سرکوب دیمریزاسیون دائمی HER2 می‌باشد. ستوکسیماب، یک آنتی‌بادی ضد دومن اتصالی EGF پروتئین ErbB1/HER، مانع فعال‌سازی گیرنده به‌واسطه لیگاند می‌شود. این دارو در حال آزمایش بر روی بیمارانی است که سرطان‌های سلول سنگفرشی سر و گردن یا سرطان‌های غیرسلول کوچک ریه را دارند. انواع مختلفی از داروهای ملکولی کوچک برضد دومن‌های تیروزین کینازی خارج‌سلولی پروتئین‌های Erb/HER طراحی شده‌اند. این داروها مهارکننده‌های رقابتی جایگاه‌های اتصالی ATP کینازها، به‌خصوص زیرنوع ErbB1/HER1، می‌باشند. این داروها در حال آزمایش بر روی بیمارانی هستند که از سرطان‌های غیرسلول کوچک ریه رنج می‌دهند که به شیمی درمانی‌های دیگر پاسخ نمی‌دهند.

1. Non-small-cell lung cancer
2. Cetuximab (IMC-C225 or Erbitux® from ImClone)



شکل ۱۶-۱۳ نقش ras GTPase طی تبدیل پیام داخل‌سلولی توسط یک تیروزین کیناز گیرنده‌ای.

روی خود Ras می‌شوند؛ این جابه‌جایی همراه با تجمع ملکول‌های Ras با یک کونفورماسیون فعال متصل به GTP می‌باشد. به نوبه خود، پروتئین‌های Ras فعال‌شده به‌طورموقتی به سرین- ترئونین پروتئین کینازها اتصال یافته و با تحریک آنها سبب آغاز آبشار پروتئین



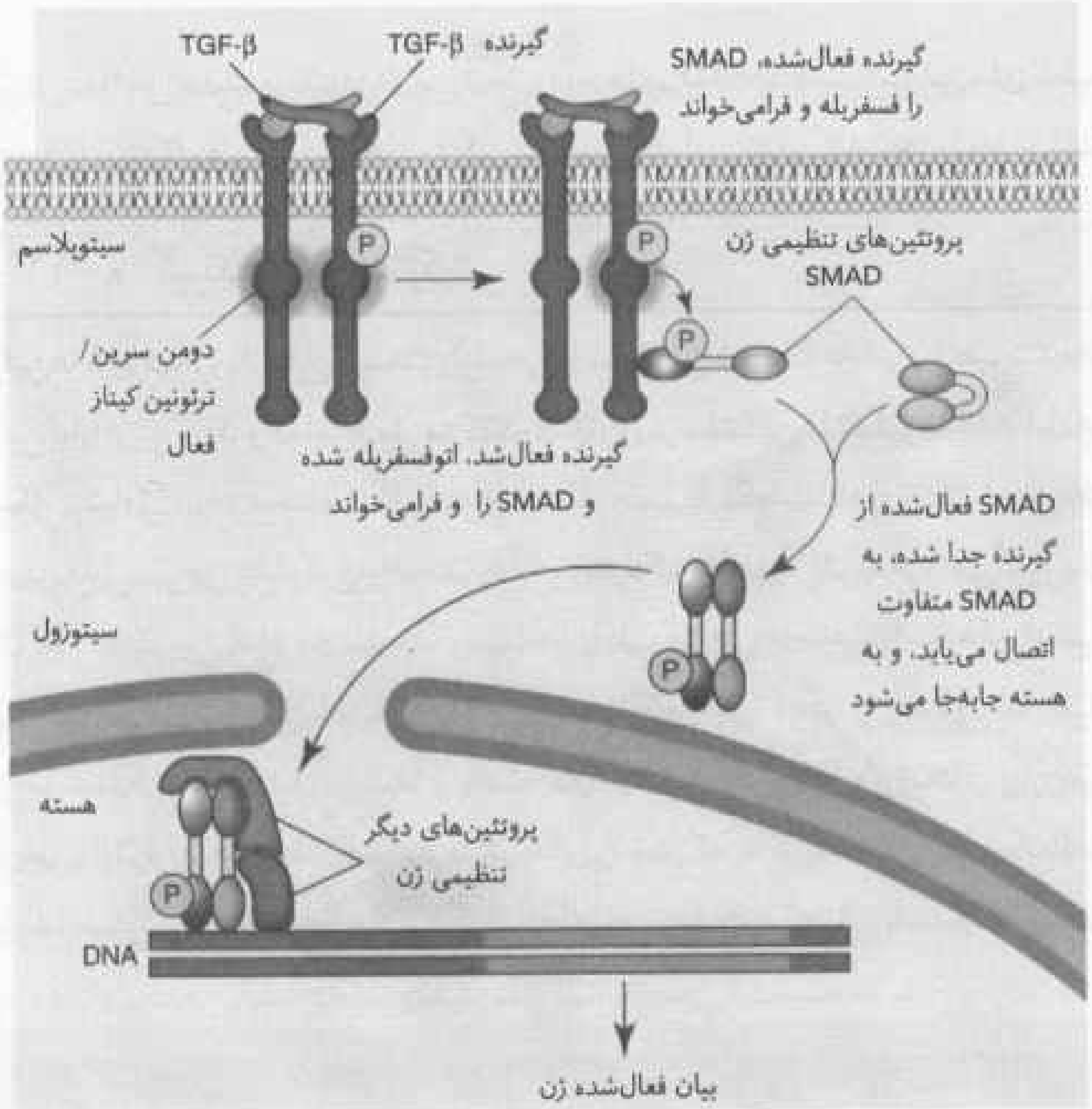
شکل ۱۷-۱۳ نقش آبشار MAP کیناز در هنگام تبدیل پیام داخل‌سلولی توسط یک تیروزین کیناز گیرنده‌ای فعال‌شده.

کینازی فعال‌شونده توسط میتوژن[1] یا آبشار **MAP کیناز** می‌شوند (شکل ۱۷-۱۳). با عمل متوالی سه کیناز، این آبشار تقویت می‌شود؛ کیناز ابتدایی که توسط Ras فعال شده است (یا MAP کیناز کیناز کیناز) مجموعه‌ای از MAP کیناز کینازهای واسط را فعال می‌کند که خود فعال‌کننده افکتورهای **MAP کیناز** انتهایی هستند. MAP کینازهای انتهایی فعال‌شده، پروتئین‌های هدف متعدی را در داخل سیتوزول و هسته، شامل فاکتورهای رونویسی، فسفریله می‌کنند که بیان ژن‌های مورد نیاز برای تقسیم سلول، بقاء سلول، یا تمایز فنوتیپی را فعال می‌سازند.

سرین- ترئونین کینازهای گیرنده‌ای

فاکتورهای تنظیمی رشد **فاکتور رشد ترانسفورمه‌کننده β**[2] **($TGF-\beta$)** و **پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوان**[3] **(BMP)** گیرنده‌هایی با فعالیت سرین/ترئونین کینازی ذاتی دارند. این فاکتورهای رشد نقش‌های مهمی را در نمو بافتی طی مراحل جنینی و نوزادی و حفظ یک فنوتیپ بافتی تمایزیافته در ارگانیسم‌های بالغ بازی می‌کنند. همانند حالت تیروزین کینازهای گیرنده‌ای، جهش در گیرنده $TGF\text{-}\beta$ و سایر گیرنده‌های سرین/ترئونین کینازی در شروع یا پیشرفت

1. Mitogen-activated protein kinase cascade
2. b - Transforming growth factor-
3. Bone morphogenetic proteins



شکل ۱۸-۱۳ آبشارهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی که طی فعال‌سازی توسط $TGF\beta$ (فاکتور رشد ترانسفورمه-کننده β) از طریق یک سرین/ترئونین کیناز گیرنده‌ای آغاز می‌گردند.

برخی سرطان‌ها نقش دارند. به‌طور مشابه، این گیرنده‌ها متشکل از پروتئین‌های غشایی با یک انتهای آمینوی خارج‌سلولی، یک ناحیه پل‌زننده-عرض‌غشایی واحد، و یک انتهای کربوکسیل داخل‌سلولی حاوی دومن کاتالیتیک هستند. این گیرنده‌ها همچنین به دنبال اتصال آگونیست به دومن‌های خارج‌سلولی پشت‌سرهم، تولید کمپلکس‌های هُمودیمری می‌کنند (شکل ۱۸-۱۳). تغییر کونفورماسیونی حاصل سبب می‌شود تا یک زیرواحد کاتالیتیک، زیرواحد پارتنر خود را بر روی ریشه‌های سرین/ترئونین فسفریله کند. این فسفریلاسیون ابتدایی به زیرواحد پارتنر امکان فراخوانی و فسفریلاسیون پروتئین‌های سیتوپلاسمی تحت عنوان SMADs را می‌دهد که شامل خانواده‌ای از فاکتورهای تنظیمی ژن هستند. (پروتئین‌های SMAD هُمولوگ‌های پروتئین MAD[1] دروزوفیلیا و پروتئین SMA در C.elegans[2] می‌باشند؛ این نام ترکیبی از هر دو است). در حالت دفسفریله، SMADها یک کونفورماسیون تاشده را اتخاذ نموده که مانع تعامل آنها با سایر SMADها شده و موقعیت آنها را نیز به‌عنوان پروتئین‌های سیتوزولی حفظ می‌کند. هرچند، با فسفریلاسیون توسط کینازهای گیرنده‌ای فعال‌شده، برخی زیرنوع‌های SMAD باز شده و کمپلکس‌های دیمری را با سایر انواع SMAD به‌وجود می‌آورند. این دیمریزاسیون همچنین **توالی‌های تمرکز هسته**[3] **(NLS)** موجود در SMADها را در معرض قرار داده که سبب جابه‌جایی کمپلکس

1. Mothers against decapentaplegic
2. C. elegans protein SMA
3. Nuclear localization sequences

سیتوزولی به داخل هسته می‌شود؛ در این محل، دیمرهای SMAD با سایر پروتئین‌های تنظیمی ژن تعامل نموده تا رونویسی ژن‌های درگیر در نمو اعضاء و تمایز بافت‌ها را تعدیل کنند.

۷-۱۳ • گیرنده‌های سیتوکینی

سیتوکین‌ها گروه دیگری از پلی‌پپتیدهای ترشحی را شامل می‌شوند که به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اتوکرین/پاراکرین رشد و تمایز عمل می‌کنند. بسیاری از سیتوکین‌ها رشد و تمایز سلول‌های **خونساز**[1]، شامل انواع مختلف گلبول‌های سفید خون یا لکوسیت‌ها، را کنترل می‌کنند. به همین دلیل، برخی سیتوکین‌ها تحت عنوان **اینترلوکین‌ها** مورد اشاره قرار می‌گیرند، زیرا انتقال اطلاعات بین انواع مختلف لکوسیت‌ها را طی مراحل مختلف پاسخ‌های ایمنی و التهابی تنظیم می‌کنند (ارتباط بالینی ۲-۱۳). سیتوکین‌های دیگر را به‌دلیل تداخل[2] با تغییر در عملکرد القاءشده سلول‌ها و بافت‌های مبتلا به عفونت با **پاتوژن‌های** ویروسی و باکتریایی، **اینترفرون** می‌نامند. همانند فاکتورهای رشدی که به گیرنده‌های کاتالیتیک اتصال می‌یابند، سیتوکین‌ها با تمایل بالا به گیرنده‌های مربوطه خود اتصال یافته و فعال‌سازی

ارتباط بالینی ۲-۱۳

آنتاگونیست‌های داخلی گیرنده‌های اینترلوکین-۱ برای درمان بیماری‌های التهابی

اینترلوکین-۱ (IL-1) یک نام مرکب برای اشاره به دو سیتوکین مرتبط (IL-1α و IL-1β) می‌باشد که به گیرنده‌های چندزیرواحدی IL-1 (IL-1R) یکسانی اتصال می‌یابند. بیان گسترده IL-1R نقش مرکزی IL-1 در بسیاری از پاسخ‌های ایمنی، التهابی، متابولیکی و خونسازی است. اینها شامل تب، افزایش بیان پروتئین‌های چسبندگی لکوسیتی بر روی سلول‌های آندوتلیال، القاء پروتئین‌های فاز حاد توسط کبد، تولید تحریک‌شده سایر سیتوکین‌ها و فاکتورهای محرک کلونی می‌باشند. IL-1β یک سیتوکین پیش‌التهابی مهم است که مقادیر موضعی و گردش خون آن شدیداً تحت تنظیم قرار داشته تا مانع فعال‌سازی نامناسب مسیرهایی شود که می‌توانند منجر به بیماری‌های التهابی مزمن گردند. IL-1β به‌عنوان یک پروسیتوکین فاقد فعالیت بیولوژیکی، در سیتوپلاسم منوسیت‌ها و ماکروفاژها تجمع می‌یابد. فعال‌سازی این پروسیتوکین به شکل بالغ ترشحی، نیاز به تجزیه آن توسط پروتئاز کاسپاز-۱ دارد. فعال‌سازی کاسپاز-۱ مستلزم اولیگومریزاسیون از طریق همایش کمپلکس‌های چندپروتئینی تحت عنوان اینفلامازوم‌ها می‌باشد. تحت شرایط طبیعی، همایش اینفلامازوم‌ها تحت تنظیم پروتئین‌های آداپتوری قرار دارد که تنها در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی یا آسیب بافتی فعال می‌شوند. هرچند، برخی افراد نسخه‌های جهش‌یافته این پروتئین‌های آداپتور را بیان می‌کنند و این منجر به فعال‌سازی اینفلامازوم‌ها[1] و افزایش تولید IL-1β در غیاب عفونت میکروبی می‌شود. تولید بیش از حد IL-1β با چندین بیماری التهابی نظیر سندروم‌های تب دوره‌ای، بیماری کرون، آرتریت روماتوئید و نقرس مرتبط است. عوامل درمانی نظیر آنتاگونیست گیرنده IL-1 (آنکینرا یا کینرت[2])، در درمان این سندروم‌های خودالتهابی بسیار مؤثر هستند. قابل ذکر است که آنکینرا یک نسخه نوترکیب یک پروتئین طبیعی، یعنی IL-1Ra (Ra برای آنتاگونیست گیرنده[3]) است که توسط سلول‌های بنیادی تولید می‌شود که IL-1α و IL-1β را ترشح می‌کنند. IR-1Ra داخلی یک پروتئینی ضدالتهابی طبیعی مهم در آرتریت، کولیت، و سایر بیماری‌های التهابی می‌باشد؛ حفظ تعادل بین تولید IL-1 و IL-1Ra مانع ایجاد یا پیشرفت چنین بیماری‌هایی می‌شود. هرچند، وقتی IL-1 داخلی در افراد دارای جهش‌هایی در پروتئین‌های تنظیمی اینفلامازوم به میزان بیش از حد تولید می‌شود، تزریق IL-1Ra نوترکیب در جهت حفظ این تعادل عمل می‌کند.

1. Inflammasomes 2. Anakinra or Kineret
3. Receptor antagonist

1. Hematopoietic 2. Interfere

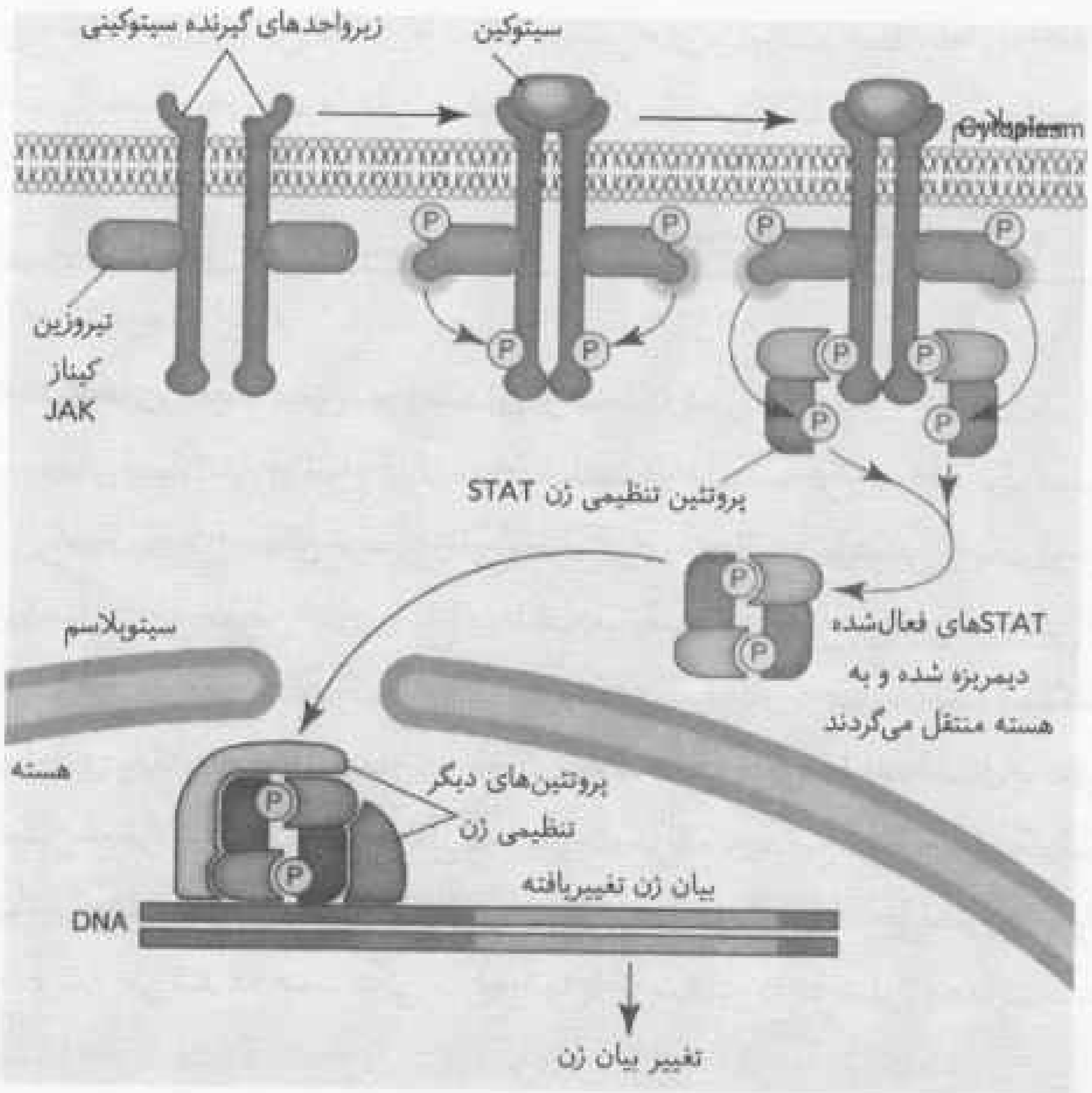
سریع آبشارهای پروتئین کینازی و تجمع پروتئین‌های پیام‌رسان فسفریله‌ای را آغاز می‌کنند که نهایتاً سبب تغییرات طولانی-مدت در بیان ژن می‌شوند. هرچند، گیرنده‌های غشاء پلاسمایی مربوط به سیتوکین‌ها فاقد فعالیت تیروزین کینازی یا سرین/ترئونین کینازی ذاتی است (شکل ۴c-۱۳ را ببینید).

گیرنده‌های سیتوکینی: ساختمان و عملکرد

گیرنده‌های سیتوکینی از انواع گیرنده‌های مولتیمری هستند. هر زیرواحد یک دومن عرض غشایی، یک دومن انتهای آمینوی خارج‌سلولی برای اتصال به سیتوکین و یک دومن انتهای کربوکسیل داخل‌سلولی حاوی انواع مختلف موتیف‌های تعامل پروتئین-پروتئین ولی فاقد فعالیت آنزیمی ذاتی، دارد. گیرنده‌های سیتوکینی وظیفه‌دار به صورت یک **کمپلکس هترو-اولیگومری** پایدار از دو یا چند زیرواحد گیرنده مختلف وجود دارند. اتصال با تمایل بالای سیتوکین معمولاً نیاز به تعامل حداقل دو زیرواحد گیرنده دارد. این اتصال هماهنگ لیگاندهای سیتوکینی خارج‌سلولی، تغییرات کونفورماسیونی را در دومن‌های داخل‌سلولی زیرواحدهای گیرنده آغاز می‌کند که همبستگی سریع آنها با آنزیم‌های داخل‌سلولی هدایت‌کننده-پیام را تسهیل می‌نماید. گیرنده‌های سیتوکینی تنوع قابل‌توجهی را در ساختمان زیرواحدهای مجزا، و همچنین در کمپلکس‌های مولتیمری همایش‌یافته خود، نشان می‌دهند. لذا زیرخانواده‌های مختلف، دامنه وسیعی از پروتئین‌های پیام‌رسان داخل‌سلولی را به‌خدمت می‌گیرند. مهمترین این پروتئین‌ها، **تیروزین کینازهای غیرگیرنده‌ای** نظیر کینازهای خانواده src و **Janus کینازها (JAKs)** می‌باشند (شکل ۱۹-۱۳). این تیروزین کینازها، پروتئین‌های درون غشایی نیستند و به صورت محلول یا با اتصال سُست به پروتئین‌های مرتبط با غشاء وجود دارند که تنها در هنگام پیوستن به گیرنده‌های سیتوکینی متصل به لیگاند، فعال می‌شوند. این کینازها اغلب زیرواحدهای دیگر گیرنده سیتوکینی را بر روی ریشه‌های تیروزین فسفریله می‌کنند که بعداً به‌عنوان جایگاه‌های شناسایی برای اتصال پروتئین‌های پیام‌رسان دیگری عمل می‌کنند که دومن‌های تعامل SH2- دارند. بدین‌ترتیب، چندین گیرنده سیتوکینی نوع-اینترلوکینی، JAKها را فرا می‌خوانند که گیرنده‌ها را برای تولید جایگاه‌های اتصالی برای پروتئین‌های تنظیم‌کننده ژن‌ها، تحت عنوان **STATs (مبدل‌های پیام و فعالگرهای رونویسی**[1]**)**، فسفریله می‌کنند. همانند پروتئین‌های SMAD، پروتئین‌های غیرفسفریله STAT منومرهای سیتوزولی هستند. فسفریلاسیون بعدی ریشه‌های تیروزین توسط JAKs سبب القاء دیمریزاسیون می‌شود که نتیجه آن جابه‌جایی کمپلکس به داخل هسته و پیوستن به سایر پروتئین‌های تنظیمی ژن می‌باشد.

گیرنده‌های سیتوکینی دیگر، پروتئین‌های آداپتوری را به خدمت می‌گیرند که همایش کمپلکس‌های پروتئین کینازی را آغاز می‌کنند که منجر به جابه‌جایی کمپلکس **NFκB**

1. Signal transducers and activators of transcription



شکل ۱۹-۱۳ آبشارهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی که توسط گیرنده سیتوکینی شاخص غیرکاتالیتیک آغاز می‌شود.

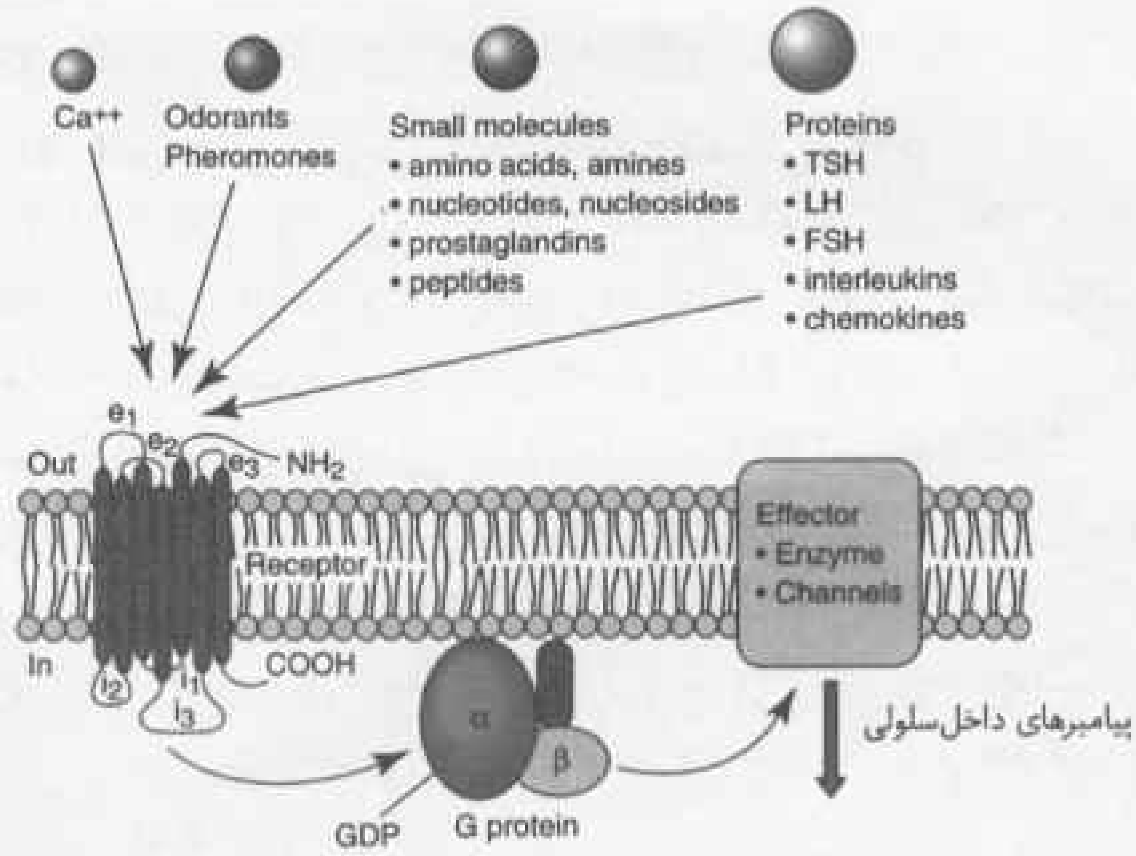
(فاکتور هسته‌ای سلول‌های B فعال‌شده[1]) از سیتوزول به هسته می‌شوند؛ این کمپلکس یک فاکتور رونویسی مهم برای تنظیم بیان ژن‌های درگیر در انواع متعددی از پاسخ‌های ایمنی و التهابی است. همچنین بسیاری از گیرنده‌های سیتوکینی، فعال‌سازی آبشارهای MAP کینازی را آغاز می‌کنند.

۸-۱۳ • گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G

نقش‌های فیزیولوژیک و لیگاندهای خارج‌سلولی

فوق خانواده **گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G (GPCR)** هدف دامنه بسیار متنوعی از لیگاندهای آگونیستی شامل پروتئین‌ها، پپتیدها، مشتقات آمینو اسیدی، کاتکول‌آمین‌ها، لیپیدها، نوکلئوتیدها و نوکلئوزیدها می‌باشند (شکل ۲۰-۱۳). این لیگاندها شامل هورمون‌ها، نوروترانسمیترها و مدیاتورهای موضعی هستند. گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G نقش‌های مهمی را در پیام‌رسانی آندوکرین، سیناپسی، پاراکرین یا اتوکرین در تمامی بافت‌ها و انواع سلول‌ها بازی می‌کنند. برآورد شده است که چندین درصد ژن‌های انسانی، GPCR را کد می‌کنند. لیگاندها با تمایلاتی در دامنه نانومولار تا میکرومولار به GPCRها اتصال می‌یابند که حدواسط تمایل بالای گیرنده‌های مرتبط با آنزیم و تمایل پایین گیرنده‌های کانالی دریچه‌دار لیگاندی می‌باشد. بسیاری از پروتئین‌های حسی مهم، نظیر رودوپسین شکل -

1. Nuclear factor of activated B cells



شکل ۲۰-۱۳ عناصر اصلی تبدیل پیام که توسط گیرنده‌های ۷-عرض‌غشایی جفت‌شده با پروتئین G شروع می‌شوند.

۲۱-۲۳ و بسیاری از گیرنده‌های مربوط به احساس چشایی و بویایی که لیگاندهای واقعی بسیاری از آنها ناشناخته است، جزء گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G می‌باشند. در بسیاری از موارد GRCR در تنظیم حاد پاسخ‌های فیزیولوژیکی مهمی نظیر انقباض قلبی، متابولیسم و رفتار پیچیده، نقش دارند. این گیرنده‌ها یا مسیرهای فرودست پیام‌رسانی آنها، اهدافی برای بسیاری از داروهایی هستند که گسترده‌ترین کاربرد را در درمان بیماری‌های انسانی دارند (ارتباطات بالینی ۳-۱۳ و ۵-۱۳).

ساختمان گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G

در هنگام اتصال به گیرنده، GPCRها به عنوان GEF برای **پروتئین‌های تنظیمی اتصال به GTP (پروتئین‌های G) هتروتریمری** عمل می‌کنند (شکل ۲۰-۱۳ را ببینید) که با پروتئین‌های افکتور فرودستی تعامل دارند که معمولاً آنزیم یا کانال یونی هستند. GPCRها مستقیماً پروتئین‌های افکتور را تنظیم نمی‌کنند. لذا حتی ابتدایی‌ترین حوادث پیام‌رسانی نیاز به همکاری حداقل پنج پروتئین دارد: خود گیرنده، پروتئین G واسط (با سه زیرواحد پروتئینی مجزای آن)، و پروتئین افکتور. وجود انواع مختلف پروتئین G که می‌تواند به‌شکل متمایزی به گیرنده‌ها و افکتورهای مختلف اتصال یابد، سبب تنوع ملکولی قابل‌توجه در انواع مسیرهای هدایت پیام تحت کنترل این گیرنده‌ها می‌شود.

برخلاف تنوع فوق‌العاده لیگاندهای مربوط به GPCR، خود گیرنده‌ها شدت بالای تشابه ساختمانی، ولی نه توالی، را نشان می‌دهند (شکل ۲۰-۱۳ را ببینید). ساختمان کریستالی رودوپسین گاوی، خصوصیات توپوگرافیکی ضروری خانواده GPCR را نشان می‌دهد (شکل ۲۱-۲۳ را ببینید). هر گیرنده یک پروتئین غشایی تک زیرواحدی است که هفت

ارتباط بالینی ۳-۱۲

گیرنده‌های کموکینی جفت‌شده با پروتئین G به عنوان اهدافی برای ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV)

در میان حدود ۱۰۰۰ ژن انسانی کدکننده گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G، زیرگروهی از گیرنده‌های کموکینی وجود دارند که در لکوسیت‌ها (گلبول‌های سفید خون) به میزان بسیار زیادی بیان می‌شوند. کموکین‌ها شامل حدود ۵۰ فاکتور پلی‌پپتیدی هستند که توسط انواع مختلفی از سلول‌ها (برای مثال، سلول‌های اپی‌تلیال و سلول‌های زمینه‌ای) در بافت‌های مختلف بیان می‌شوند. این فاکتورها، لیگاندهای آگونیستی برای ۱۹ نوع گیرنده کموکینی شناخته‌شده هستند که به شکل متمایزی در کلاس‌های مختلف لکوسیتی (برای مثال، منوسیت‌ها، لنفوسیت‌های T، لنفوسیت‌های B و سلول‌های کشنده طبیعی) بیان می‌شوند که مسئول به اجرا گذاشتن پاسخ‌های ایمنی و التهابی در داخل بافت‌هایی هستند که مورد تهاجم عوامل بیماریزای خارجی (تک یاخته‌ها، باکتری‌ها یا ویروس‌ها) قرار گرفته‌اند. کموکین‌ها به عنوان (۱) عوامل کموتاکتیک که لکوسیت‌ها را به محل بافت عفونت‌یافته فرا می‌خوانند، (۲) تنظیم‌کننده‌های مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به پروتئین G، و (۳) القاءکننده‌های بیان ژن که در ایمنی تطابقی طولانی-مدت با عوامل بیماریزا نقش دارند، عمل می‌کنند. تعجب‌آور نیست که اختلال یا ناتوانی پیام‌رسانی گیرنده کموکینی در دامنه وسیعی از بیماری‌های عفونی نقش داشته باشند. این یافته اهمیت خاصی دارد که ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) از GPCR کموکینی داخلی برای ایجاد عفونت و کشتن لکوسیت‌های افکتور ایمنی استفاده می‌کند. ورود HIV به داخل لکوسیت‌ها نیازمند تعامل مستقیم گلیکوپروتئین (gp120) پوششی ویروسی با پروتئین‌های سطحی خارج‌سلولی سلول میزبان هدف می‌باشد. پروتئین غشایی CD4، یک گیرنده ایمنی مهم لنفوسیت‌های T کمک‌کننده، یکی از اهداف اصلی برای اتصال gp120 است. این موضوع نشان می‌دهد که چرا سلول‌های T کمک‌کننده در اکثر مبتلایان به عفونت HIV که دچار ایدز (سندروم نقص ایمنی انسان) شده‌اند، کاهش می‌یابد. هر چند، سوش‌های مختلفی از HIV ترجیحاً لنفوسیت‌های T (ویروس T-تروپیک) یا منوسیت- ماکروفاژها (ویروس M- تروپیک) را عفونی می‌کنند و بررسی‌های اپیدمیولوژیکی افرادی را آشکار نموده‌اند که شدیداً نسبت به سوش‌های M- تروپیک HIV مقاوم هستند. این مقاومت ناشی از جهش‌هایی در ژن کدکننده CCR5 می‌باشد که یک گیرنده کموکینی است که شدیداً در منوسیت- ماکروفاژها بیان می‌شود؛ این جهش‌ها منجر به کاهش یا عدم بیان پروتئین سطح سلولی CCR5 می‌گردند. به همین دلیل، سوش‌های M- تروپیک HIV برای ایجاد عفونت مؤثر در منوسیت- ماکروفاژها نیاز به‌وجود همزمان CCR5 و CD4، به عنوان کمک‌گیرنده، دارند.

CXCR4، به عنوان یک گیرنده کموکینی که شدیداً در لنفوسیت‌های T بیان می‌شود، کمک‌گیرنده‌ای[1] برای CD4 جهت اتصال gp120 سوش‌های T- تروپیک می‌باشد. توانایی CCR5 و CXCR4 برای اتصال به gp120 نیاز به فعال‌سازی پروتئین‌های خانواده Gi ندارد که در حالت طبیعی این گیرنده‌ها با آنها جفت می‌شوند. با وجود اینکه فعال‌سازی پروتئین G توسط CCR5 و CXCR4 برای ورود HIV اجباری نیست، اتصال gp120 به این گیرنده‌ها سبب القاء فعال‌سازی آبشارهای پیام‌رسانی فرودست پروتئین G می‌شود. به‌نظر می‌رسد که فعال‌سازی این مسیرهای پیام‌رسانی در داخل سلول‌های عفونت‌یافته به HIV ممکن است جذب شیمیایی لکوسیت‌های عفونت‌یافته بومی را تسهیل نموده و بدین‌ترتیب به پیشرفت و انتشار ویروس در داخل فرد مبتلا کمک کند. شناسایی CCR5 و CXCR4 به کمک‌گیرنده‌های HIV، علاقه شدید به تولید لیگاندهای آنتاگونیستی را توجیه می‌کند که به‌طور انتخابی اتصال gp120 را تضعیف نموده و سبب تأخیر در کلونیزاسیون و انتشار این عامل بیماریزای ویران‌کننده در افراد مبتلا می‌شود.

1. Coreceptor

دومن پل‌زننده عرض‌غشایی مارپیچ α دارد. (GPCR تحت عنوان گیرنده **دومن ۷-عرض غشایی** یا **هفت‌مارپیچی**[1] نیز نامگذاری شده است). هر کدام از این گیرنده‌ها دارای یک انتهای آمینوی خارج‌سلولی، سه قوس خارج‌سلولی، سه قوس داخل‌سلولی و یک انتهای کربوکسیل داخل‌سلولی است. ناحیه خارج‌سلولی محل‌هایی را برای گلیکوزیلاسیون فراهم

1. Heptahelical

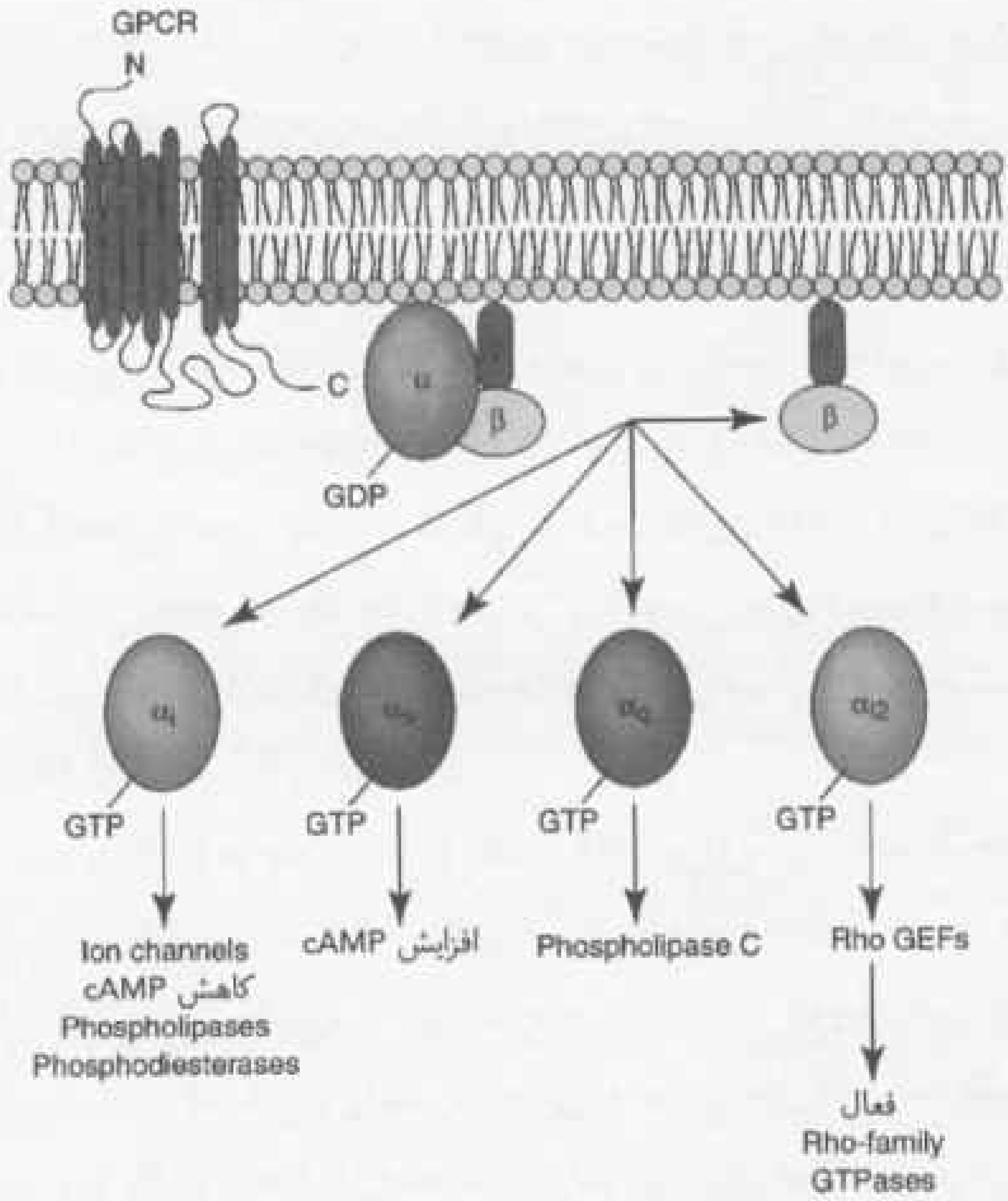
می‌کند و قوس‌های خارج‌سلولی حاوی ریشه‌های سیستئین ضروری برای تولید پل‌های دی‌سولفیدی بین‌قوسی هستند. دومن‌های پل‌زننده عرض‌غشایی (TM) هُمولوگوس هستند، ولی در میان GPCRهای مختلف یکسان نمی‌باشند. اینها پاکتی را به‌وجود می‌آورند که اغلب حاوی ریشه‌های اسید آمینه مهم برای اتصال به لیگاند است. قوس‌های داخل سلولی، به‌خصوص قوس سوم، حاوی توالی‌های مهمی برای تعامل انتخابی با پروتئین‌های G هستند. دم داخل‌سلولی از نظر طول و توالی در میان گیرنده‌های مختلف تنوع زیادی دارد و حاوی جایگاه‌هایی است که در شناسایی یا فعال‌سازی پروتئین‌های G همکاری دارند. این دم همچنین حاوی جایگاه‌های سرینی یا ترئونینی برای فسفریلاسیون توسط پروتئین کینازها است. فسفریلاسیون این ریشه‌ها نقش‌های مهمی را در خاتمه هدایت پیام توسط GPCR فعال‌شده بازی می‌کنند.

ساختمان سوم GPCR موجود در داخل غشاءهای بیولوژیکی مستلزم ایجاد تجمعی از هفت مارپیچ عرض‌غشایی است که کونفورماسیون‌ها و موقعیت انتهای کربوکسیل و قوس‌های داخل‌سلولی را کنترل می‌کنند. لیگاندهای بزرگی نظیر هورمون‌های پلی‌پپتیدی به قوس‌های خارج‌سلولی اتصال می‌یابند، در حالی‌که لیگاندهای کوچک، نظیر استیل-کولین و اپی‌نفرین، به پاکت حاصل از قطعات پل‌زننده بر روی غشاء اتصال می‌یابند. در هر صورت، اتصال منجر به نوآرایی مارپیچ‌های پل‌زننده بر روی غشاء و تغییراتی در کونفورماسیون انتهای کربوکسیل و قوس‌های داخل‌سلولی در جهت ارائه جایگاه‌های شناسایی برای پروتئین‌های G خاص می‌شود. لذا یک GPCR که به یک آگونیست اتصال یافته است، به‌طور موقتی کمپلکسی را با یک پروتئین G ایجاد می‌کند. یک آنتاگونیست می‌تواند به گیرنده اتصال یابد، ولی سبب نوآرایی مناسب دومن‌های پل‌زننده بر روی غشاء یا ارائه جایگاه‌های شناسایی پروتئین G بر روی دم و قوس‌های داخل‌سلولی نمی‌گردد.

تعامل موقت بین گیرنده اتصال‌یافته به آگونیست و پروتئین G آن، بر روی عملکرد هر دو تأثیر می‌گذارد. تغییر اصلی در گیرنده به‌دنبال اتصال آن به پروتئیبن G، کاهش قابل‌توجه تمایل آن به آگونیست می‌باشد و این تغییر معمولاً منجر به جدایی آگونیست می‌شود. گیرنده فاقد آگونیست، کونفورماسیون‌های غیرفعالی را اتخاذ می‌کند که همراه با از دست‌رفتن توانایی آن در تعامل با پروتئین G می‌باشد. پروتئین G از کمپلکس گیرنده-پروتئین G جدا شده و گیرنده به وضعیت غیرفعال فاقد لیگاند خود برمی‌گردد.

پروتئین‌های هتروتریمری G

پروتئین‌های G که از نظر عملکرد با GPCR جفت می‌شوند، متشکل از کمپلکس‌های هتروتریمری **زیرواحدهای** α، β و γ می‌باشند (شکل ۲۱-۱۳). زیرواحد α، به‌عنوان بزرگترین زیرواحد، یک پروتئین نسبتاً آبدوست با اندازه ۳۹ تا ۴۶ kDa می‌باشد. این پروتئین حاوی جایگاه اتصال به نوکلئوتید گوانین، فعالیت GTPase که برای تنظیم مناسب



شکل ۲۱-۱۳ زیرکلاس‌های اصلی پروتئین‌های G هتروتریمری که توسط گیرنده‌های ۷- عرض‌غشایی جفت‌شده با پروتئین G فعال می‌شوند.

تعامل گیرنده- پروتئین G لازم است، و دومن‌هایی برای تعامل با افکتورهای مختلف می‌باشد. بیست زیرواحد α متفاوت براساس خصوصیات ساختمانی و جفت‌شدن با پروتئین‌های افکتور خاص و آبشارهای پیامبر دوم، به صورت زیرخانواده‌هایی گروه‌بندی شده‌اند. زیرواحدهای α_s (زیرواحد α تحریکی[1]) خانواده G_s سبب تحریک **آدنیلات سیکلاز** می‌شوند که نتیجه آن افزایش **cAMP** داخل سلولی می‌باشد (ارتباط بالینی ۴-۱۳). برعکس، زیرواحدهای α_i (زیرواحد α مهاری[2]) خانواده G_i سبب مهار **آدنیلات سیکلاز** و کاهش میزان cAMP سلولی می‌شوند. زیرواحدهای α_o و α_z که متعلق به خانواده G_i هستند، عمدتاً کانال‌های یونی حساس به ولتاژ را در بافت‌های تحریک‌پذیر تعدیل می‌کنند. خانواده G_i همچنین شامل زیرواحدهای α_t (t برای ترانس‌دوسین[3]) می‌باشد که پروتئین‌های G برای تبدیل احساس نور توسط GPCR نوع رودوپسینی می‌باشد که **cGMP فسفودی‌استراز** را تحریک نموده و سبب کاهش سریع cGMP داخل سلولی می‌شود. خانواده **Gq** شامل زیرواحدهای α_q، α_{11}، α_{15} و α_{16} می‌باشد که با **فسفولیپاز C** جفت شده و افزایش سه پیامبر دوم را آغاز می‌کند: IP_3 (اینوزیتول تریس‌فسفات)، **DAG** (دی‌آسیل‌گلیسرول) و Ca^{2+}. بالاخره، زیرواحدهای α_{12} و α_{13} خانواده $G_{12/13}$ سبب تحریک **GEF** برای انواع مختلفی از GTPaseهای کوچک خانواده Rho می‌شود که در مهاجرت سلولی، تنظیم شکل سلول، و تقسیم سلولی دخالت دارند (ارتباط بالینی ۴-۱۳).

1. Stimulatory 2. Inhibitory 3. Transducin

ارتباط بالینی ۴-۱۳

جهش‌های پروتئین G در تومورهای غده هیپوفیز و بیماری‌های آندوکرین

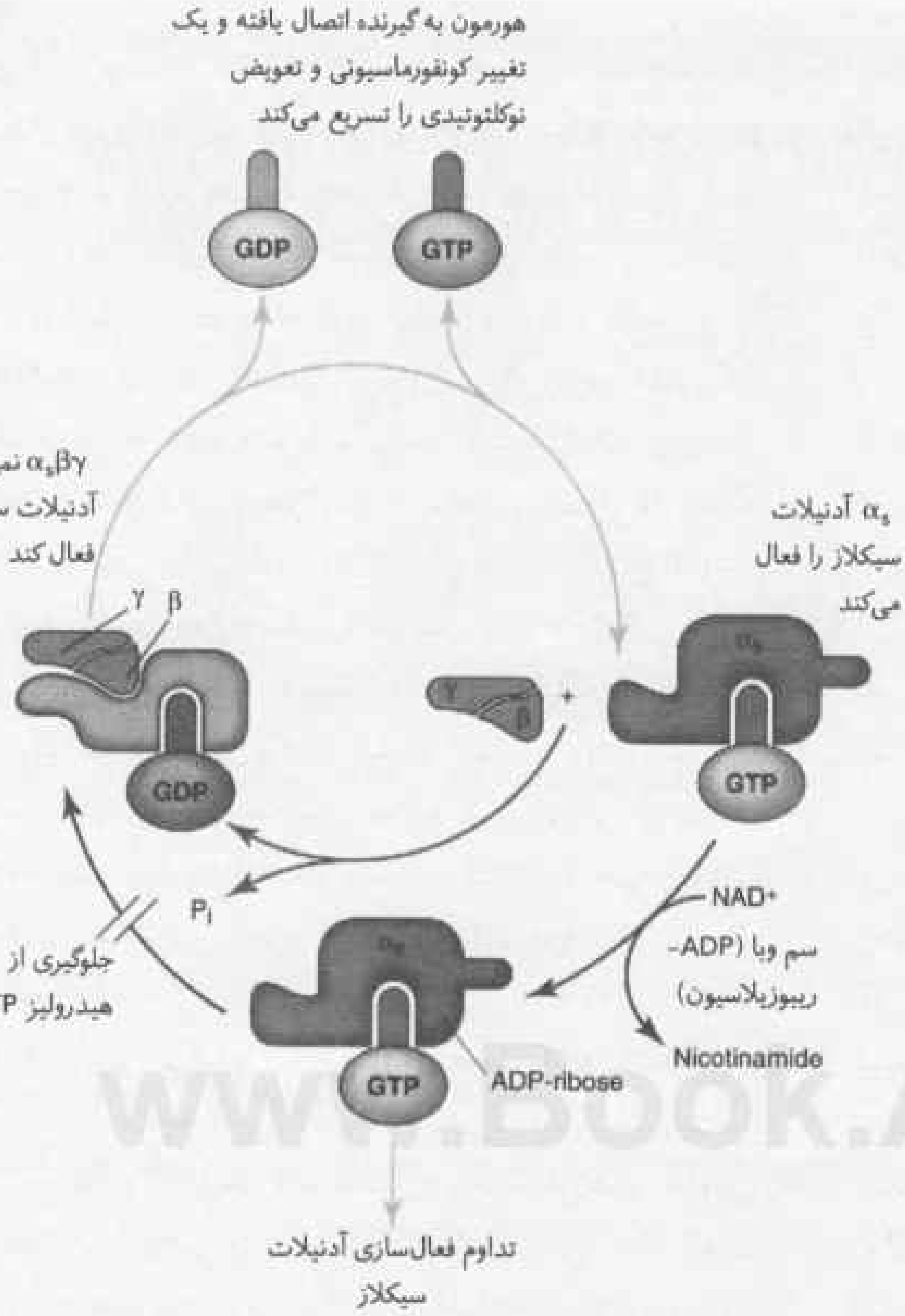
غده هیپوفیز از طریق ترشح انواع مختلفی از هورمون‌هایی که عملکرد اعضاء دیگری نظیر کبد، تیروئید، آدرنال و غدد تولیدمثلی را تنظیم می‌کنند، نقش مرکزی را در تنظیم وضعیت آندوکرین پستانداران دارد. آزادسازی این هورمون‌ها تحت تنظیم نوروترانسمیترها، نوروپپتیدها و هورمون‌های دیگری قرار دارند که توسط ناحیه هیپوتالاموسی مغز آزاد می‌شوند. برای مثال، هیپوتالاموس و سلول‌های هیپوفیزی تحت عنوان سوماتوتروف‌ها، به شکل هماهنگ با یکدیگر در جهت کنترل آزادسازی هورمون رشد (GH) عمل می‌کنند که متابولیسم و رشد سلولی را در بسیاری از بافت‌های محیطی تنظیم می‌کند. هورمون آزادکننده هورمون رشد (GHRH) که از هیپوتالاموس آزاد می‌شود، آگونیستی برای یک گیرنده جفت‌شده با پروتئین G_s است که در سلول‌های سوماتوتروف هیپوفیز بیان می‌شود. افزایش cAMP که از این گیرنده منشاء می‌گیرد، رونویسی وابسته به CREB ژن هورمون رشد را فعال نموده و سبب افزایش سنتز و آزادسازی GH می‌شود. برخی تومورهای انسانی منجر به ترشح بیش از حد هورمون رشد می‌شوند که در بزرگسالان منجر به آکرومگالی می‌گردد؛ این حالت با الگوهای رشد غیرطبیعی در بسیاری از بافت‌ها مشخص می‌گردد. این نوع تومورهـا معمولاً غیرمتاستاتیک هستند و معتقدند در نتیجه همانندسازی واحد سلول‌های هیپوفیزی ترانسفورمه شده‌ای حاصل می‌شوند که به دلیل جهش‌های خود به خودی در ژن‌های تنظیمی کلیدی، مزیت رشد یا بقاء را به دست آورده‌اند.

۳۰٪ تا ۴۰٪ تومورهای هیپوفیزی انسانی که GH را ترشح می‌کنند، یک نسخه جهش‌یافته ژن GNAS1 را بیان می‌کنند که کدکننده زیرواحد α_s پروتئین G_s است. این ژن جهش‌یافته، تحت عنوان *gsp*، همراه با یک جایگزینی تک اسید آمینه‌ای در ریشه‌هایی است که نقش‌های کلیدی را در اتصال و هیدرولیز GTP بازی می‌کنند. این نوع جهش‌ها به میزان زیادی فعالیت GTPase را کاهش داده و به موجب آن سبب فعال‌سازی دائمی G_s و آدنیلات سیکلاز می‌شود. افزایش فعالیت آدنیلات سیکلاز به میزان قابل‌توجهی تولید cAMP، فعال‌سازی پروتئین کیناز A (PKA)، فسفریلاسیون CREB و سایر پروتئین‌های تنظیمی ژن حساس به cAMP به‌واسطه PKA را افزایش داده و، در نتیجه، بیان ژن‌های قابل‌القاء توسط cAMP نظیر GH را بالا می‌برد. جهش‌های *gsp* مشابهی در تومورهای کورتیکوتروف هیپوفیزی یافت شده‌اند که سبب افزایش ترشح ACTH (هورمون کورتیکوتروپیک) همراه با تولید بیش از حد هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی توسط کورتکس آدرنال می‌شود.

با مطالعات بیوشیمیایی در آزمایشگاه، دو اسید آمینه تغییریافته در این جهش‌های *gsp* که به‌طور طبیعی وجود دارند، مورد شناسایی قرار گرفتند که برای تنظیم فعالیت GTPase مهم هستند. آرژنین-۲۰۱ که در اکثر جهش‌یافته‌های *gsp* توسط سیستئین جایگزین شده است، جایگاه گیرنده برای ADP- ریبوزیلاسیون کووالانی است که توسط سم وبا القاء می‌شود. گلوتامین-۲۲۷ که در برخی جهش‌های *gsp* توسط آلانین یا اسیدهای آمینه دیگر جایگزین می‌شود، یک گلوتامین حفظ‌شده می‌باشد که در دومن سوییچ-II قرار دارد که برحسب اتصال به GTP یا GDP به زیرواحد α، متحمل حرکات کونفورماسیونی بزرگی می‌شود. جایگزینی این گلوتامین در داخل تمامی زیرواحدهای α شناخته‌شده منجر به کاهش فعالیت GTPase می‌شود و به‌میزان زیادی برای تولید نسخه‌های دائماً فعال پروتئین‌های G مختلف برای مطالعات حیوانی ترانس‌ژنیک مورد استفاده قرار می‌گیرد.

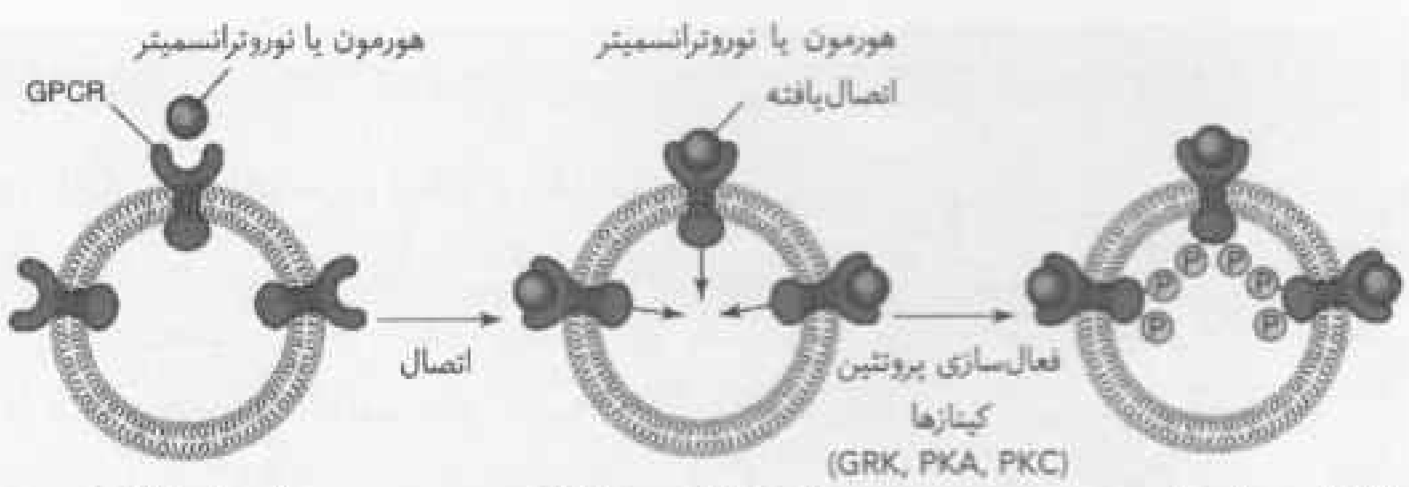
چرخه پروتئین G

در حالت پایه خود، کمپلکس هتروتریمری $\alpha\beta\gamma$ در جایگاه اتصال به نوکلئوتید زیرواحد α خود حاوی GDP است (شکل ۲۲-۱۳). سرعت آزادسازی GDP در حضور گیرنده اشغال‌نشده (حالت پایه) پایین است، ولی صفر نمی‌باشد. فعالیت GTPase ذاتی زیرواحد α سبب تبدیل GTP به GDP و Pi می‌شود. در حالی‌که Pi به راحتی آزاد می‌شود، ولی GDP برای مدت بسیار بیشتری به شکل اتصال‌یافته باقی می‌ماند. این آزادسازی متوالی سبب می‌شود تا واکنش GTPase غیرقابل‌برگشت شود. α-GDP تمای بالایی برای دیمر $\beta\gamma$ دارد و لذا تولید هتروتریمر می‌شود. در نتیجه، در حالت پایدار تحریک‌نشده، تنها کسر



شکل ۲۲-۱۳ چرخه فعال‌سازی و غیرفعال‌سازی یک پروتئین G هتروتریمری.

کوچکی از ملکول‌های پروتئین G در کونفورماسیون فعال (متصل به GTP) باقی می‌مانند. به دنبال تعامل یک کمپلکس هتروتریمری با GPCR متصل به آگونیست، سرعت آزادسازی GDP بیش از ده برابر افزایش می‌یابد. در نتیجه، GTP که در سیتوزول بسیار فراوان‌تر از GDP است، امکان اتصال به زیرواحد α و آغاز جدایی α-GTP از دیمر $\beta\gamma$ را پیدا می‌کند. سپس زیرواحدهای α آزادشده و دیمرهای $\beta\gamma$ با آنزیم‌های افکتور مناسب فرودست تعامل نموده تا میزان پیامبر دوم را تغییر دهند. فعال‌سازی پروتئین‌های G توسط GPCR متصل به آگونیست از نوع کاتالیتیک، و نه استویکیومتری، می‌باشد. لذا برحسب نوع GPCR، یک ملکول گیرنده متصل به آگونیست ممکن است به‌طور متوالی با ۱۰ تا ۱۰۰ ملکول پروتئین G تریمری تعامل نموده و این موضوع سبب تقویت قابل‌توجه پیام در مراحل ابتدایی فعال‌سازی GPCR می‌شود. با وجود اینکه فعالیت GTPase ذاتی زیرواحدهای α آزادشده تضمین می‌نماید که جدایی کمپلکس هتروتریمری $\alpha\beta\gamma$ موقتی باشد، تا زمانی که GPCR متصل به آگونیست در غشاء پلاسمایی سلول وجود دارد، میزان تکرار کلی این چرخه افزایش خواهد یافت.



شکل ۲۳-۱۳ فسفریلاسیون گیرنده به عنوان یک مکانیسم اصلی برای حساسیت‌زدایی/غیرفعال‌سازی گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G

خاتمه پیام‌رسانی توسط گیرنده‌های جفت‌شده با پروتئین G

بسیاری از لیگاندهای کوچک GPCR می‌توانند سریعاً توسط آنزیم‌های خارج‌سلولی متابولیزه یا غیرفعال شوند و اکثر گیرنده‌ها **حساسیت‌زدایی** یا تطابق سریع را نشان می‌دهند. با وجود اینکه مقداری از این تطابق ناشی از درون‌کشی[1] و تنظیم-کاهشی[2] گیرنده است، مکانیسم اصلی برای حساسیت‌زدایی سریع GPCR مستلزم فسفریلاسیون گیرنده است که منجر به ازدست‌رفتن عملکرد آن می‌شود (شکل ۲۳-۱۳). گیرنده‌های فسفریله نمی‌توانند به شکل کارآمدی پروتئین‌های G را فعال کنند. دو خانواده از پروتئین کینازها GPCR را فسفریله نموده و سبب حساسیت‌زدایی می‌شوند. پروتئین کینازهای وابسته به پیامبرهای دوم، نظیر **پروتئین کیناز A(PKA)** وابسته به cAMP، بسیاری از انواع GPCRها را بدون توجه به اینکه گیرنده کونفورماسیون متصل به آگونیست یا بدون آگونیست دارد را فسفریله می‌کنند. پروتئین کینازهای اختصاصی GPCR[3] **(GRKs)**، تحت عنوان **βARKs** (βAR کینازها) نیز مورد اشاره قرار می‌گیرند، زیرا برای اولین بار گیرنده β-آدرنرژیک (βAR) به‌عنوان سوبسترای آن مورد شناسایی قرار گرفت (ارتباط بالینی ۵-۱۳). برخلاف PKA و سایر پروتئین کینازهای وابسته به پیامبر دوم، **βARKs** تنها GPCR را در زمان اتصال به لیگاندهای آگونیستی، فسفریله می‌کنند.

اثرات سموم باکتریایی بر روی پروتئین‌های هتروتریمری G

برخی زیرواحدهای α پروتئین‌های G حاوی ریشه‌های آرژینین و سیستئینی هستند که می‌توانند توسط اگزوتوکسین‌ها (توکسین‌های مربوط به وبا و سیاه سرفه) ترشحی توسط برخی باکتری‌های بیماریزا، نظیر *Vibrio cholerae* و *Bordetella pertussis*، ADP-ریبوزیله شوند (شکل ۲۲-۱۳ را ببینید). این سموم دارای فعالیت NAD گلیکوهیدرولازی

1. Internalization
2. Down-regulation
3. GRCR-specific protein kinases

ارتباط بالینی ۵-۱۳

تغییر پروتئین‌های پیام‌رسانی گیرنده β-آدرنرژیک در نارسایی احتقانی قلب[1]

قلب در نارسایی احتقانی نمی‌تواند میزان کافی خون را برای خون‌رسانی مناسب بافت‌های محیطی پمپ کند. نارسایی قلب نتیجه تطابق میوسیت‌های قلبی برای حفظ برون‌ده قلبی بعد از آسیب قلبی یا نتیجه بار هُمودینامیکی زیادی، مثل فشار خون بالا، می‌باشد. این تطابق‌ها شامل هیپرتروفی میوکارد و فعال‌سازی خروجی عصب سمپاتیک، به‌خصوص آزادسازی نوراپی‌نفرین و اپی‌نفرین از اعصاب آدرنرژیک قلب، می‌باشند که انقباض‌پذیری میوکارد را زیاد می‌کنند. این مکانیسم‌های تطابقی نهایتاً ناکارآمد شده و منجر به کاهش پیشرونده در قابلیت اجرایی قلب می‌گردد.

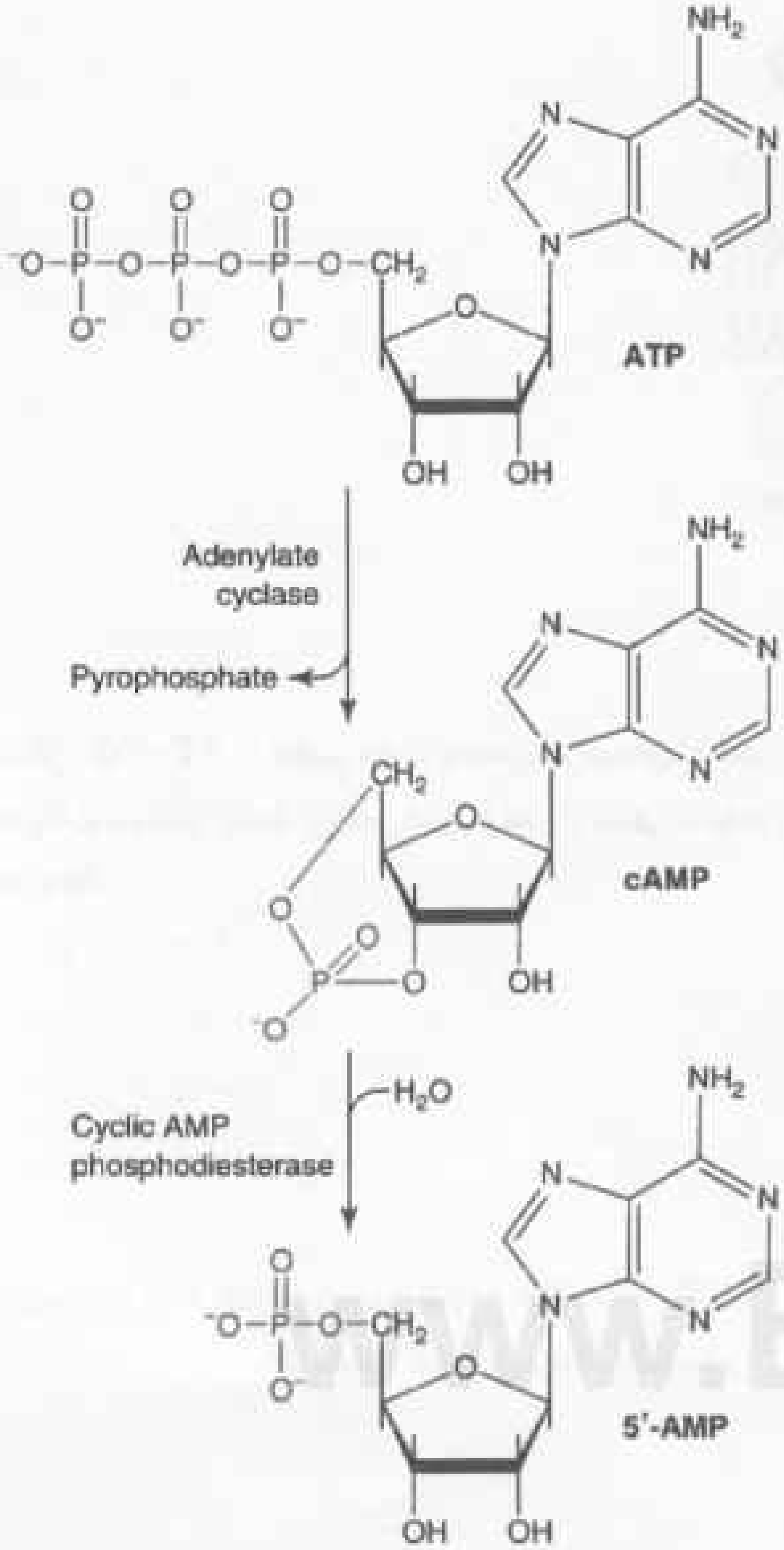
تغییر از پاسخ تطابقی به سوء تطابق[2] به‌خصوص با تغییر در سیستم پیام‌رسانی گیرنده β-آدرنرژیک مشخص می‌باشد. در میوسیت‌های قلبی طبیعی، اپی‌نفرین گیرنده‌های $\beta 1$- و $\beta 2$-آدرنرژیک جفت‌شده با G_s را فعال می‌کند که از طریق تحریک آدنیلات سیکلاز سبب افزایش تجمع cAMP و فعال‌سازی پروتئین کیناز A (PKA) می‌گردد. PKA کانال‌های Ca^{2+} حساس به دی‌هیدروپیریدین نوع L و فسفولامبان[3]، یک تنظیم‌کننده آلوستریک ATPase جابه‌جاکننده Ca^{2+} شبکه سارکوپلاسمی (SR) قلبی، را فسفریله می‌کند. با فسفریلاسیون این کانال‌ها، مدت زمان بازماندن آنها در پاسخ به پولاریزاسیون افزایش یافته که نتیجه آن افزایش ورود Ca^{2+} به‌داخل می‌باشد. فسفولامبان غیرفسفریله عملکرد پمپ SR Ca^{2+} ATPase را سرکوب می‌کند. با فسفریلاسیون توسط PKA، این اثر مهاری فسفولامبان برداشت می‌شود که نتیجه آن افزایش میزان و وسعت پمپ Ca^{2+} توسط SR می‌باشد. عمل مرکب افزایش ورود Ca^{2+} به داخل سلول از طریق (کانال‌های نوع L) غشاء پلاسمایی و افزایش پنهان‌سازی Ca^{2+} در داخل SR منجر به میزان بیشتر آزادسازی Ca^{2+} القاءشده توسط Ca^{2+} از SR طی پتانسیل عمل قلبی بعدی می‌شود. لذا در هنگام تحریک آدرنرژیک، Ca^{2+} بیشتری طی هر پتانسیل عمل آزاد شده که نتیجه آن انقباض قوی‌تر (اثر اینوتروپیک مثبت[4]) می‌باشد. هرچند، Ca^{2+} آزاد شده نیز سریع‌تر توسط SR پنهان‌سازی شده که نتیجه آن یک چرخه سریع‌تر انقباض/شل‌شدن (اثر کرونوتروپیک مثبت[5]) می‌باشد. لذا در سطح کل عضو، تحریک β-آدرنرژیک قلب منجر به انقباضات قوی‌تر و پمپ حجم خون بیشتر در هر انقباض (حجم ضربان) و یک چرخه سریع‌تر انقباض/شل‌شدن (ضربان قلب) می‌شود. برون‌ده قلبی (حاصلضرب حجم ضربان در ضربان قلب) افزایش یافته تا خون بیشتری به گردش خون عمومی تحویل داده شود. هرچند، این به معنی آن است که قلب کار بیشتری انجام می‌دهد (برون‌ده انرژی بیشتر) و نیاز به دریافت اکسیژن و متابولیت‌های (اسیدهای چرب و گلوکز) بیشتری برای تولید این انرژی می‌باشد.

به دلیل کاهش عملکرد قلب به‌واسطه بیماری مزمن، نارسایی قلبی منجر به افزایش ترشح اپی‌نفرین/نوراپی‌نفرین برای فراهم‌سازی یک افزایش فعالیت جبرانی پاسخ‌های پیام‌رسانی شرح داده شده می‌شود. در حالی‌که این موضوع در ابتدا فعالیت گیرنده‌های $\beta 1$ و $\beta 2$ را افزایش می‌دهد، سبب حساسیت‌زدایی و تنظیم-کاهشی مزمن آنها نیز می‌گردد. به‌علاوه، این گیرنده‌های β به شکل رو به افزایشی سایر آبشارهای پیام‌رسانی را فعال می‌کنند. برای مثال، گیرنده‌های $\beta 1$ آبشارهایی، نظیر کاهش بیان ژن‌های بقاء و افزایش فعالیت پیام‌های پروآپوپتوتیک، را فعال می‌کنند که غالباً سوء تطابق هستند. طی دوره ایجاد نارسایی قلبی، کاهشی در نسبت گیرنده‌های زیرنوع $\beta 1$ به گیرنده‌های زیرنوع $\beta 2$ وجود دارد. نارسایی قلبی همچنین فعالیت GRK2/βARK کیناز را افزایش می‌دهد که این گیرنده‌ها را فسفریله نموده و آنها را از فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به پروتئین G جدا می‌کند.

هرچند ممکن است متناقض به‌نظر برسد، درمان نارسایی قلبی براساس آنتاگونیست‌های β-آدرنرژیک (مسدودکننده‌های β[6])، در اکثر موارد **متوپرولول**[7] یا بیزوپرولول[8]، می‌باشد که شدیداً برای گیرنده‌های $\beta 1$ انتخابی هستند. به‌نظر می‌رسد تأثیر درمان با مسدودکننده β- مستلزم سرکوب مسیرهای پیام‌رسانی سوء تطابقی می‌باشد که توسط گیرنده‌های $\beta 1$ فعال می‌گردند. مطالعات بالینی اخیر بی‌فایدگی **کارودیلول**[9] را گزارش کرده‌اند که به‌طور غیرانتخابی هر دو گیرنده $\beta 1$- و $\beta 2$-آدرنرژیک را مسدود می‌کند، ولی آنتاگونیست گیرنده‌های $\alpha 1$-آدرنرژیک نیز می‌باشد که به‌میزان زیادی در سلول‌های عضله صاف عروقی بیان می‌شوند. این گیرنده‌های آبشار G_q/فسفولیپاز C را فعال نموده و با آزادسازی مخازن Ca^{2+} وابسته به IP_3 منجر به انقباض عضله صاف و انقباض عروق خونی می‌شود. آنتاگونیسم این پاسخ‌ها سبب کاهش مقاومت در برابر جریان خون و کاهش کار مورد نیاز قلب برای ارائه برون‌ده قلبی مؤثر می‌شود.

1. Congestive heart failure
2. Maladaptive
3. Phospholamban
4. Positive Inotropic effect
5. Positive chronotropic effect
6. β - Blockers
7. Metoprolol
8. Bisoprolol
9. Carvedilol

برای تجزیه NAD^+ به نیکوتینامید و ADP-ریبوز، و فعالیت ADP-ریبوزیل ترانسفراز برای کاتالیز انتقال بخش ADP-ریبوز به زیرواحد α پروتئین G هستند. این واکنش‌های ریبوزیلاسیون که توسط توکسین کاتالیز می‌شوند، با عملکرد طبیعی پروتئین G تداخل نموده و سبب اختلال در هدایت پیام و تنظیم عملکرد سلول می‌شود. برای مثال، ADP-ریبوزیلاسیون زیرواحدهای α در G_s توسط توکسین وبا سبب سرکوب فعالیت GTPase ذاتی آن و بنابراین جدایی دائمی زیرواحدهای α متصل به GTP از دیمرهای $\beta\gamma$ حتی در زمان عدم اتصال آگونیست به GPCR می‌شود. این افزایش مزمن در α_s متصل به GTP سبب القاء فعال‌سازی مداوم آدنیلات سیکلاز و تولید cAMP می‌شود. در روده بزرگ، این افزایش cAMP منجر به تداوم فسفریلاسیون کانال‌های کلری به‌واسطه PKA می‌شود که در حالت طبیعی انتقال آب و نمک را تنظیم می‌کنند؛ افزایش بیش از حد فعالیت این کانال‌ها به شدت انتقال آب و نمک را مختل نموده و سبب اسهال کشنده می‌شود.



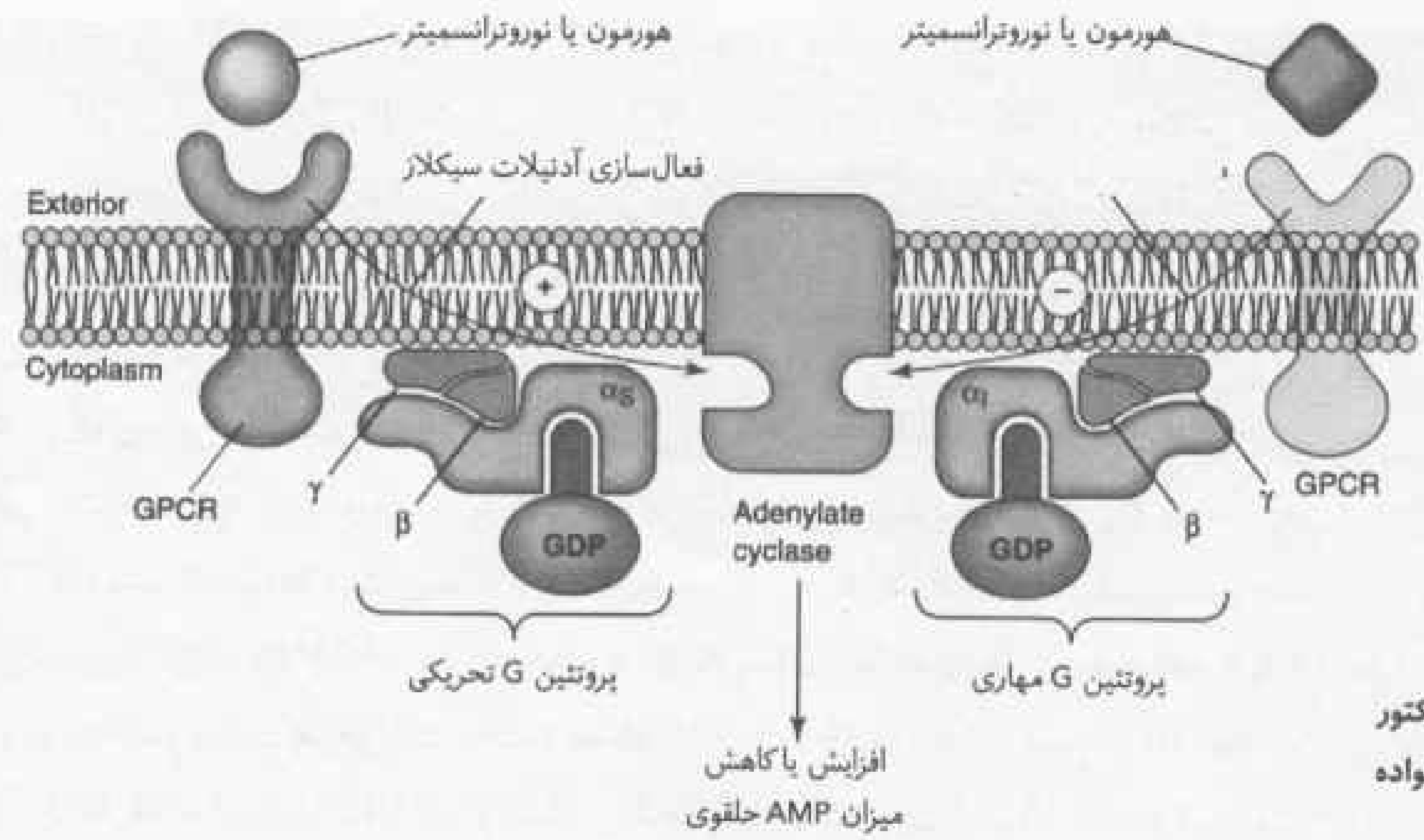
شکل ۲۴-۱۳ سنتز و تخریب AMP حلقوی توسط آدنیلات سیکلازها و فسفودی‌استرازهای نوکلئوتید حلقوی.

۹-۱۳ • هدایت پیام cAMP-محور

تنظیم سنتز و تجزیه AMP حلقوی

بسیاری از پاسخ‌های متابولیکی و رفتاری به هورمون‌ها و نوروترانسمیترهای مختلف به‌واسطه افزایش cAMP داخل‌سلولی صورت می‌پذیرند. استفاده از cAMP به عنوان یک پیامبر دوم به میزان زیادی به GPCRها محدود می‌گردد. سلول‌ها به‌طور فعال هم سنتز و هم تجزیه این پیامبر دوم را تنظیم می‌کنند. سنتز cAMP توسط **آدنیلات سیکلازها** کاتالیز می‌شود که از ATP به عنوان سوبسترا برای تولید cAMP و پیروفسفات (PPi) استفاده می‌کنند (شکل ۲۴-۱۳). میزان پایه طبیعی cAMP در داخل سیتوزول حدود 10^{-7} تا 10^{-6} M می‌باشد. در هنگام حداکثر تحریک هورمونی، غلظت cAMP می‌تواند برحسب نوع سلول ۲ تا ۱۰۰ برای افزایش یابد. حداقل شش ژن کدکننده زیرنوع‌های مختلف آدنیلات سیکلاز مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. تمامی اینها پروتئین‌های غشایی داخلی با ۱۲ دومن پل‌زننده بر روی غشاء، یک دومن کاتالیتیک در داخل قطعه داخل‌سلولی متصل‌کننده قطعات شش و هفت عرض‌غشایی، و یک دومن کاتالیتیکی دوم در انتهای کربوکسیل داخل‌سلولی هستند. زیرنوع‌های مختلف با الگوهای اختصاصی-بافت بیان شده و می‌توانند به شکل متمایزی توسط پروتئین‌های پیام‌رسان خاص تنظیم شوند. تمامی ایزوفرم‌های آدنیلات سیکلاز تحت تنظیم مثبت زیرواحدهای α_s پروتئین‌های G_s قرار دارند. هرچند، کمپلکس زیرواحد $\beta\gamma$ از پروتئین‌های G مختلف (شامل G_s) می‌توانند برخی ایزوفرم‌های آدنیلات سیکلاز را تحریک نموده و بقیه را مهار کنند. زیرواحدهای α_i از پروتئین‌های G_i می‌توانند مستقیماً برخی زیرنوع‌های آدنیلات سیکلاز را مهار کنند (شکل ۲۵-۱۳).

تجزیه cAMP توسط **فسفودی‌استرازهای نوکلئوتید حلقوی (PDEs)** کاتالیز می‌شوند که پیوند دی‌استری حلقوی را تجزیه و تولید AMP می‌کنند (شکل ۲۴-۱۳). فعالیت این



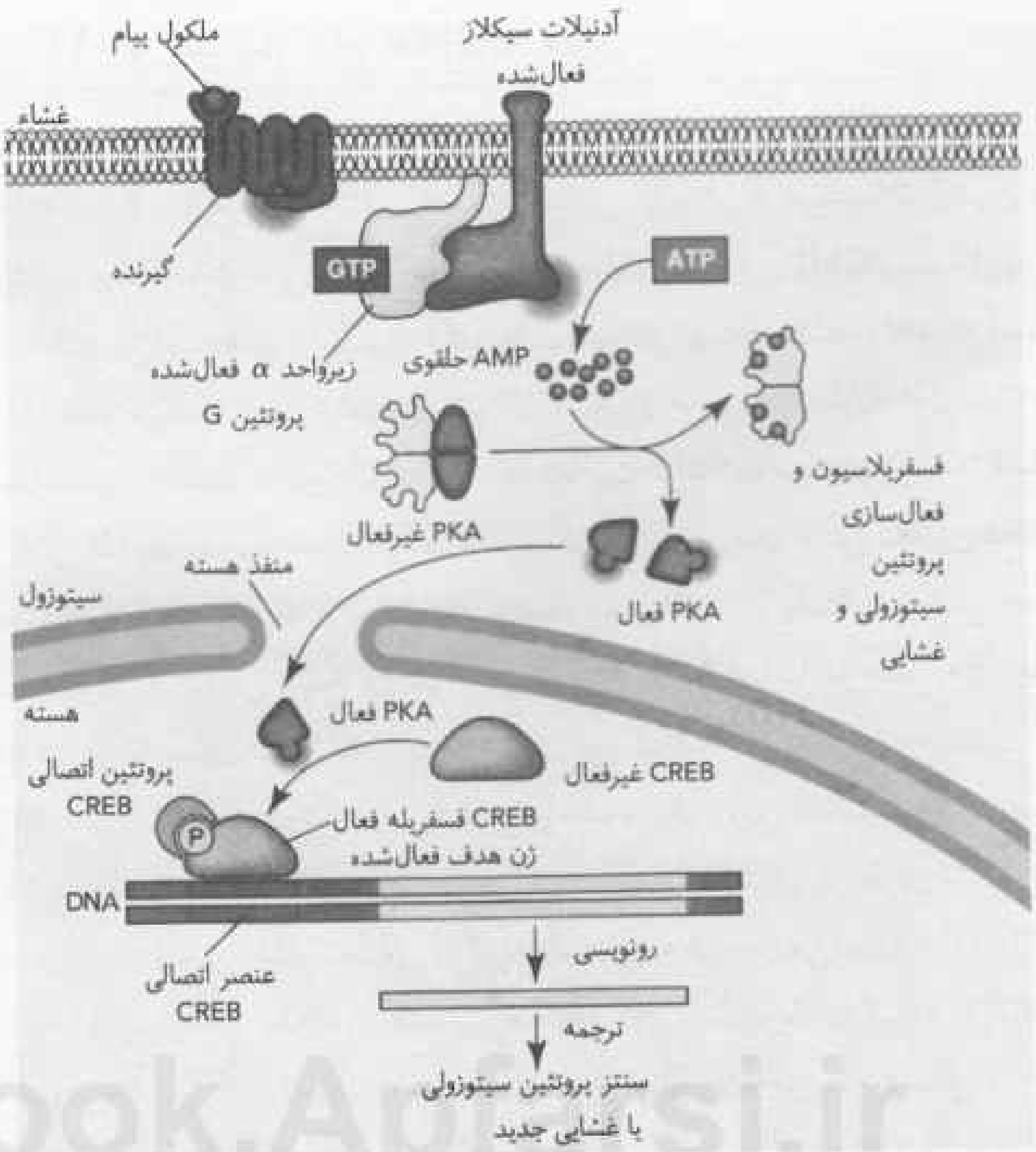
شکل ۲۵-۱۳ تنظیم مثبت و منفی آنزیم‌های افکتور آدنیلات سیکلاز توسط پروتئین‌های G هتروتریمری خانواده Gs و Gi.

PDEها را می‌توان توسط هورمون‌ها و برخی داروها تنظیم نمود. با مهار PDEها می‌توان cAMP سلولی را افزایش داد. مشتقات گزانتینی، نظیر تئوفیلین و کافئین، PDEها را مهار نموده و منجر به افزایش میزان cAMP در غیاب تحریک هورمونی می‌شوند.

مکانیسم‌های پیام‌رسانی داخل‌سلولی AMP حلقوی

بیشتر اثرات cAMP از طریق **پروتئین کیناز A (PKA)** وابسته به cAMP وساطت می‌گردد (شکل ۲۶-۱۳). PKA تترامری متشکل از دو زیرواحد تنظیمی (زیرواحدهای R) حاوی جایگاه‌های اتصال به cAMP، و دو زیرواحد کاتالیتیک (زیرواحدهای C) با فعالیت کینازی، می‌باشد. شکل تترامری قادر به کاتالیز فسفریلاسیون پروتئین‌های هدف نیست. با اتصال تعاونی چندین ملکول cAMP به زیرواحدهای تنظیمی، این تترامر تفکیک شده و زیر-واحدهای کاتالیتیکی آزاد فعال می‌شوند. بسیاری از سوبستراهای پروتئینی کیناز وابسته به cAMP خودشان کینازهایی با آنزیم‌های هدف اختصاصی هستند. این موضوع تأکیدی بر ماهیت آبشاری این سیستم (و اکثر سیستم‌های دیگر) پیام‌رسانی مرتبط با گیرنده می‌باشد. فسفاتازهای اختصاصی پروتئین‌های فسفریله را دفسفریله نموده و بنابراین این آبشار پیام‌رسانی وابسته به cAMP را غیرفعال می‌سازند. این فسفاتازها در معرض تنظیم مرتبط با گیرنده قرار دارند.

cAMP عمیقاً متابولیسم سلولی را از طریق هم تغییر فعالیت و هم تغییر بیان بسیاری از آنزیم‌های کاتابولیکی، شامل آنزیم‌های درگیر در متابولیسم لیپیدها و کربوهیدرات‌ها، تغییر می‌دهد. تنظیم متابولیکی توسط cAMP اغلب مستلزم تنظیم کینازهای دوم به‌واسطه PKA یا فسفاتازها از طریق تغییر وضعیت فسفریلاسیون این کینازها می‌باشد. PKA همچنین می‌تواند چندین نوع کانال یونی یا انتقال‌دهنده یونی غشاء پلاسمایی را فسفریله نموده



شکل ۲۶-۱۳ نقش پروتئین کیناز A در آبشارهای پیام‌رسانی تنظیمی توسط AMP حلقوی.

و منجر به تغییر پتانسیل غشایی و یا فعال‌سازی یا مهار جریان رو به داخل یون‌های تنظیمی نظیر Ca^{2+} شود. از آنجایی که نوروترانسمیترها، مثلا سروتونین، دوپامین و اپی‌نفرین، با GPCR تعامل می‌کنند که تنظیم‌کننده G_s یا G_i هستند، توانایی cAMP و PKA در تعدیل فعالیت کانال یونی، جزء کلیدی تنظیم در سیستم عصبی مرکزی است.

افزایش cAMP در سلول‌های اوکاریوتی سریعاً رونویسی و بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های متابولیکی مهم، هورمون‌های پلی‌پپتیدی و پروتئین‌های انتقال یون، را تغییر می‌دهد. جدایی زیرواحدهای کاتالیتیک از زیرواحدهای تنظیمی سبب می‌شود تا توالی‌های تمرکز در هسته بر روی زیرواحدهای کاتالیتیک نمایان شده و جابه‌جایی آنها از سیتوزول به هسته تسهیل گردد (شکل ۲۶-۱۳). PKA داخل هسته‌ای سبب القاء فسفریلاسیون و فعال‌سازی پروتئین‌های تحت تنظیم cAMP، به نام **CREBs**، در جهت کنترل بیان ژن‌هایی می‌شود که حاوی عناصر تنظیمی حساس به cAMP[1] (CRE) در نواحی ′۵ –پهلویی بسیاری از ژن‌های پاسخ‌دهنده به AMP حلقوی هستند. به این طریق، افزایش زودگذر در cAMP که توسط GPCR در سطح سلول آغاز شده است، می‌تواند به تغییرات طولانی -مدت در بیان ژن‌های هسته‌ای و عملکرد سلول تبدیل می‌شود.

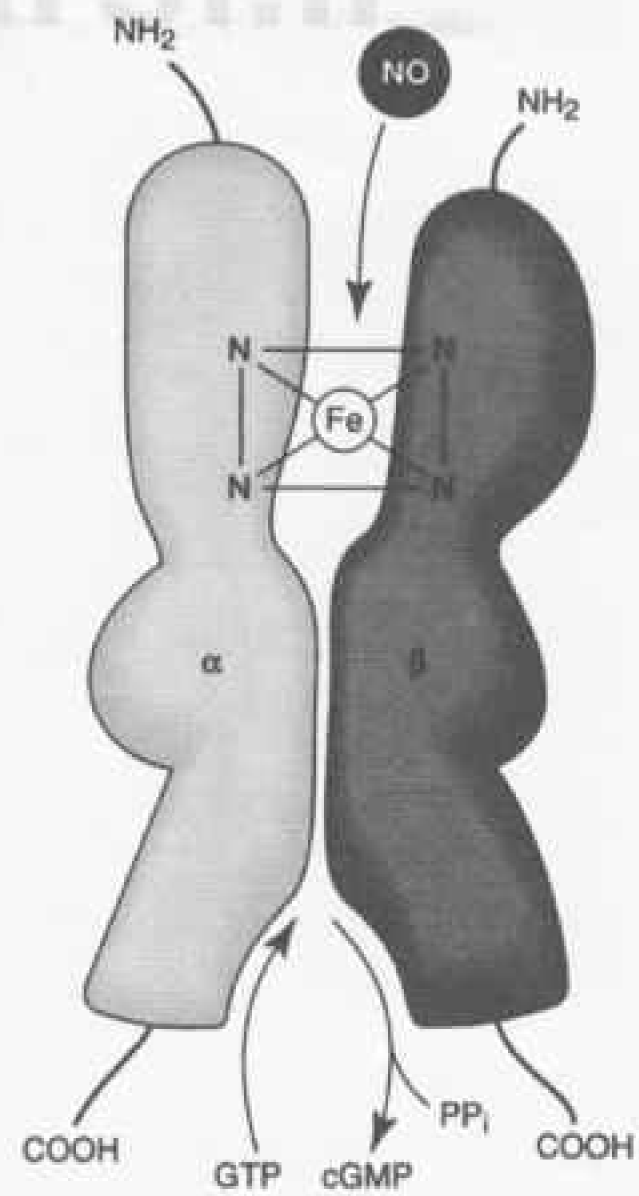
1. cAMP-sensitive regulatory elements

۱۳-۱۰ • هدایت پیام cGMP-محور

تنظیم سنتز و تجزیه GMP حلقوی

cGMP یک پیامبر دوم مهم در تنظیم قابلیت انقباض عضلانی و غیرعضلانی، در هدایت پیام بینایی، و در هومئوستاز حجم خون می‌باشد. مقادیر سلولی cGMP به‌شکل پویایی توسط تعادل بین آنزیم‌های تولیدکننده (**گوانیلات سیکلاز**) و تجزیه‌کننده (**cGMP فسفودی استراز**) تنظیم می‌شود. دو نوع اصلی گوانیلات سیکلاز موجود در سلول‌های پستانداران، تفاوت اساسی با آدنیلات سیکلاز دارند. یک فعالیت **گوانیلات سیکلاز مرتبط با غشاء** در دومن‌های کاتالیتیک گیرنده‌های مرتبط با آنزیم مربوط به هورمون **فاکتور دهلیزی دفع‌کننده سدیم**[1] (**ANF**) وجود دارد که از سلول‌های عضله دهلیز قلب در پاسخ به افزایش حجم و یا فشار خون در گردش ترشح می‌شود. گیرنده‌های ANF اساساً در سلول‌های عضله صاف عروقی و سلول‌های کلیه بیان می‌شوند. این گیرنده یک دومن خارج‌سلولی بزرگ برای اتصال ANF، یک دومن عرض‌غشایی واحد، و یک دومن کاتالیتیکی داخل‌سلولی نسبتاً کوتاه دارد. اتصال ANF منجر به تحریک فعالیت کاتالیتیکی از طریق دیمریزاسیون گیرنده و اتصال پروتئین‌های تنظیمی به گیرنده متصل به هورمون می‌شود (اشکال ۲۲-۳۲ و ۲۲-۳۳ را ببینید). بر خلاف بیان بافتی محدود گوانیلات سیکلاز گیرنده ANF، یک شکل سیتوپلاسمی گوانیلات سیکلاز در اکثر انواع سلول‌ها وجود دارد (شکل ۱۳-۲۷). این **گوانیلات سیکلاز محلول** یک کمپلکس دیمری از زیرواحدهای ۸۲ kDa و ۷۰ kDa می‌باشد. هر دیمر اتصال دائمی به یک **هِم** دارد. در غیاب لیگاندهای گازی که به این گروه هِم اتصال می‌یابند، گوانیلات سیکلاز محلول سرعت بسیار پایین کاتالیز را دارد. هرچند، اتصال **اکسید نیتریک (NO)** به گروه هِم سبب القاء تغییرات کونفورماسیونی می‌شود که به میزان زیادی فعالیت گوانیلات سیکلاز را افزایش می‌دهد. لذا یک محرک اصلی برای تجمع cGMP دراکثر سلول‌ها، میزان افزایش‌یافته NO می‌باشد. NO توسط **اکسید نیتریک سنتازها (NOS)** تولید می‌شود (ص ۶۰۳). از آنجایی‌که NO به راحتی از غشاءهای بیولوژیکی عبور می‌کند، این گاز می‌تواند در یک نوع سلول، برای مثال یک سلول آندوتلیال عروقی، تولید شده و سریعاً به سلول‌های مجاور، برای مثال سلول‌های عضله صاف عروقی، انتشار یابد و در آنجا گوانیلات سیکلاز محلول را فعال کند. تجمع cGMP در عضله صاف همراه با آغاز شل‌شدن سریع و پایدار دستگاه انقباضی در عضله صاف می‌باشد (ارتباط بالینی ۱۳-۶).

تجزیه cGMP توسط چندین **cGMP فسفودی‌استراز (PDE)** محلول یا دارای اتصال سُست به غشاء کاتالیز می‌شود. با وجود اینکه به نظر می‌رسد تعدادی از اینها آنزیم‌های کاتابولیکی غیرفعالی هستند (یعنی، مستقیماً تنظیم نمی‌شوند)، PDE وابسته به cGMP



شکل ۱۳-۲۷ اتصال NO به گوانیلات سیکلاز محلول.

1. Atrial natriuretic factor

ارتباط بالینی ۶-۱۳

پیام‌رسانی اکسید نیتریک/cGMP در ناهنجاری‌های قلبی و عروقی

سلول‌های آندوتلیالی که سطوح داخلی تمامی عروق خونی را می‌پوشانند، منابع اصلی تولید اکسید نیتریک مورد استفاده برای شل نمودن سلول‌های عضله عروقی هستند. در این میوسیت‌ها، تولید cGMP توسط گوانیلات سیکلاز به‌واسطه اکسید نیتریک تولیدی توسط سلول‌های آندوتلیال مجاور تحریک می‌شود. cGMP باعث القاء شل‌شدن میوسیت و اتساع عروق خونی همراه با افزایش جریان خون به بافت مجاور می‌شود. تغییرات مشابهی را می‌توان توسط داروهایی تولید کرد که تولید اکسید نیتریک را افزایش می‌دهند. میزان cGMP همچنین توسط فسفودی‌استرازها (PDE) تنظیم می‌گردد که cGMP را به GMP تبدیل می‌کنند. ازاینرو، داروهایی که ایزوفرم‌های عروقی PDE را مهار می‌کنند، جریان خون را به بافت‌های خاصی افزایش می‌دهند.

آنژین صدری[1] نام قدیمی است که برای درد قفسه سینه در بیماری با انواع مختلف عدم‌کفایت‌های قلبی به‌کار برده می‌شد. معمولاً در این حالت نیتروگلیسرین تجویز می‌شود که سریعاً درد را کاهش می‌دهد (ارتباط بالینی ۱۱-۱۰ را ببینید). نیتروگلیسرین به اکسید نیتریک متابولیزه می‌شود و همچنین مستقیماً به پروتئین‌های حساس به اکسید نیتریک (همانند گوانیلات سیکلاز محلول) اتصال می‌یابد. بنابراین، نیتروگلیسرین می‌تواند شل شدن عضله صاف و اتساع عروقی را القاء کند. کاملاً مشخص نیست نیترو-گلیسرین به چه شکلی درد قفسه سینه را کاهش می‌دهد. شریان‌های کرونری قلب و عروق ریز قلب در هنگام عدم‌کفایت کرونری، احتمالاً به دلیل ایسکمی موضعی، حداکثر اتساع را دارند. لذا نیتروگلیسرین احتمالاً با کاهش بار قلب و بهبود اکسیژن میوکارد از طریق تأثیرات خود در گشادنمودن وریدهایی که خون را به قلب برمی گردانند (preload)، و به موجب آن کاهش فشار خون محیطی (afterload) از طریق اثرات گشادکنندگی عروق بر روی شریان‌های سیستمیک، سبب کاهش درد قفسه سینه می‌شود.

ویاگرا[2] نام تجارتی سیترات سیلدنافیل[3] است که برای درمان اختلال نعوظی[4] استفاده می‌شود. این دارو به‌طور انتخابی مانع فعالیت فسفودی استراز نوکلئوتید حلقوی ۵ (PDE5) می‌شود که شدیداً در عضله صاف عروقی بیان می‌شود. قدرت این دارو در مهار ایزوفرم‌های دیگر PDE نوکلئوتید حلقوی نظیر PDE3 که غالباً در عضله قلب بیان می‌شود، ۸۰ تا ۴۰۰۰ برابر کمتر می‌باشد. این دارو تنها ۱۰ برابر برای PDE5 نسبت به PDE6 انتخابی‌تر است که PDE موجود در شبکیه است. وقتی عروق خونی موجود در بافت نعوظی در پاسخ به NO آزادشده و فعال‌شدن آدنیلات سیکلاز متسع می‌گردند، مهار تجزیه cGMP توسط ویاگرا سبب می‌شود تا میزان cGMP و فعالیت PKG افزایش بیشتری پیدا کرده و مدت زمان بیشتری بالا باقی بماند. این تغییر سبب افزایش اتساع عروقی در بافت نعوظی می‌شود. دوزهای بالای ویاگرا می‌تواند منجر به تغییرات خفیفی در دید رنگی به دلیل اثرات جانبی بر PDE6 شبکیه گردد.

1. Angina pectoris 2. Viagra 3. Sildenafil citrate
4. Erectile dysfunction

موجود در سلول‌های دریافت نور شبکیه، یک آنزیم افکتور برای پروتئین G تریمری ترانس دوسین می‌باشد (ص ۱۲۸۱).

مکانیسم‌های پیام‌رسانی داخل‌سلولی GMP حلقوی

GMP حلقوی بیشتر اثرات پیامبر دوم خود را از طریق فعال‌سازی **پروتئین کینازهای حساس به cGMP** (PKG)[1] به اجرا می‌گذارد که به شکل گسترده‌ای در بسیاری از بافت‌ها بیان می‌گردند. بر حسب نوع سلول، PKG انواع مختلفی از اهداف مهم، شامل آنزیم‌های درگیر در متابولیسم، پروتئین‌های ساختمانی و پروتئین‌های انتقال‌دهنده یون، را فسفریله می‌کند. برای مثال، تحریک PKG در عضله صاف و سلول‌های غیرعضلانی منجر به

1. cGMP-sensitive protein kinases

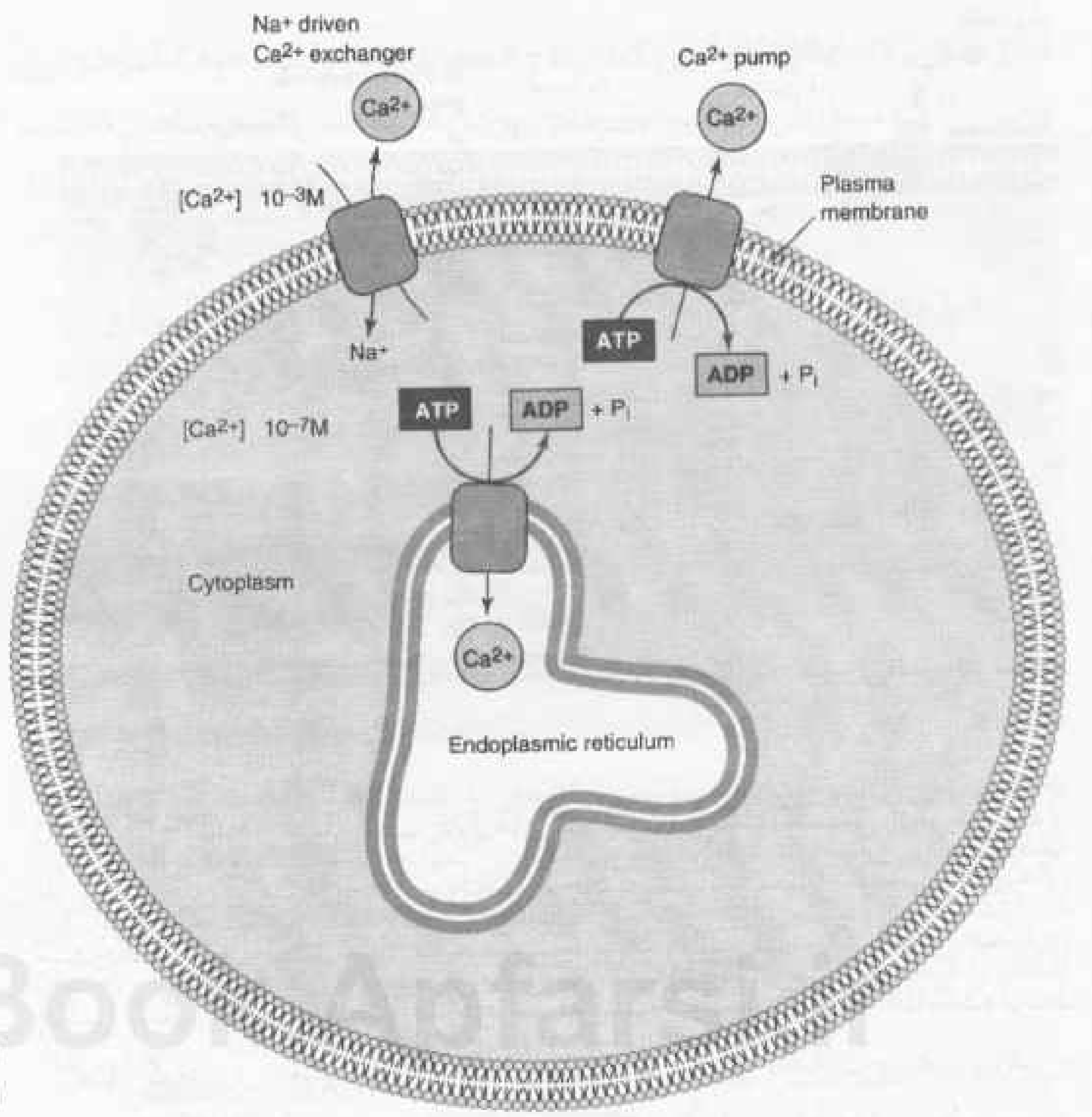
فسفریلاسیون هماهنگ بسیاری از پروتئین‌هایی می‌شود که سبب مهار انقباض یا حرکت وابسته به Ca^{2+} می‌شوند. اینها عبارتند از: (۱) پروتئین‌هایی که کانال‌های آزادسازی Ca^{2+} را در شبکه آندوپلاسمی تضعیف می‌کنند، (۲) فسفاتازهای مربوط به زنجیر سبک میوزین که تعامل میوزین با اکتین را سرکوب می‌کنند، و (۳) کانال‌های K^+ که القاء هیپرپولاریزاسیون غشاء پلاسمایی و به موجب آن سرکوب جریان رو به داخل Ca^{2+} از طریق کانال‌های دریچه‌دار ولتاژی را به همراه دارد. cGMP همچنین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مستقیم (یعنی، غیروابسته به PKG) کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار وابسته به نوکلئوتید حلقوی عمل می‌کند که در برخی بافت‌های حسی نظیر شبکیه بیان می‌شوند.

۱۱-۱۳ • هدایت پیام کلسیم-محور

تنظیم غلظت Ca^{2+} داخل‌سلولی

Ca^{2+} یک تنظیم‌کننده مهم بسیاری از فعالیت‌های سلولی اصلی شامل انقباض در تمامی انواع عضلات، ترشح هورمون‌ها و نوروترانسمیترها، تقسیم سلولی، مهاجرت مستقیم سلول‌های غیرعضلانی و تنظیم بیان ژن می‌باشد. سلول‌ها با افزایش سریع و گذرا در غلظت Ca^{2+} سیتوزولی که بعداً به انواع مختلفی از پروتئین‌های تنظیمی وابسته به Ca^{2+} اتصال می‌یابد، به بسیاری از انواع هورمون‌ها و نوروترانسمیترها پاسخ می‌دهند. افزایش Ca^{2+} سیتوزولی از طریق بازشدن کانال‌های Ca^{2+} در غشاء پلاسمایی یا کانال‌های Ca^{2+} در شبکه آندوپلاسمی (ER) صورت می‌پذیرد. این Ca^{2+} آزادشده سریعاً می‌تواند دوباره در داخل ER تجمع یافته و پاسخ به هورمون و یا نوروترانسمیتر را خاتمه دهد.

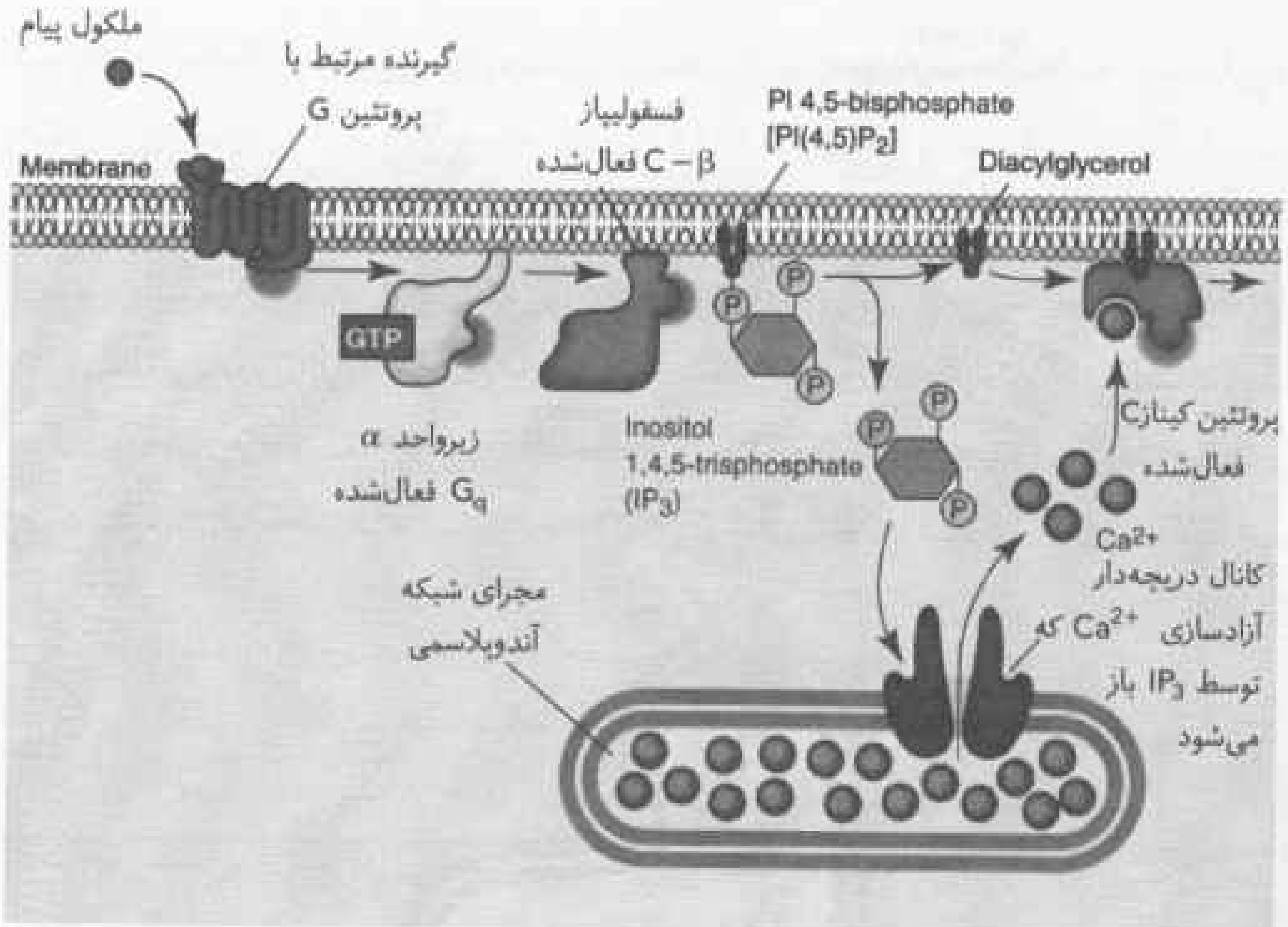
غلظت پایه Ca^{2+} آزاد در سیتوزول اکثر انواع سلول‌ها در حدود 10^{-7} M حفظ می‌شود (شکل ۲۸-۱۳). افزایش کوچک در Ca^{2+} آزاد سیتوزولی به 10^{-6} M سبب فعال‌سازی سریع و حداکثر فعالیت‌های سلولی مختلفی می‌شود که تحت تنظیم Ca^{2+} قرار دارند. از آنجایی که غلظت Ca^{2+} خارج‌سلولی برابر 10^{-3} M می‌باشد، یک شیب غلظتی ۱۰,۰۰۰ برابر برای Ca^{2+} در عرض غشاء پلاسمایی وجود دارد و نیروی پیشبرنده جریان سریع Ca^{2+} به داخل سلول به‌واسطه پتانسیل غشایی داخل-منفی افزایش بیشتری پیدا می‌کند در سلول‌های تحریک‌پذیر، نظیر نورون‌ها و سلول‌های عضلانی، جریان رو به داخل Ca^{2+} با همکاری کانال‌های Ca^{2+} دریچه‌دار ولتاژی صورت می‌پذیرد (جدول ۱۰-۱۲ را ببینید). این نوع مسیر پیام‌رسانی Ca^{2+} عموماً توسط گیرنده‌های کانال یونی مربوط به نوروترانسمیترهای تحریکی، نظیر استیل‌کولین، گلوتامات، سروتونین و ATP، آغاز می‌گردد. غشاء پلاسمایی همچنین حاوی دو سیستم انتقالی، شامل انتقال‌دهنده ناهمسوی Na^+/Ca^{2+} و ATPase انتقال‌دهنده Ca^{2+}، می‌باشد که به‌شکل موثری Ca^{2+} اضافی را به خارج سیتوزول پمپ می‌کنند (شکل ۲۸-۱۳).



شکل ۲۸-۱۳ نقش غشاء پلاسمایی و پروتئین اندامکی انتقالی Ca^{2+} در تنظیم و بخش‌بندی مخازن Ca^{2+} داخل‌سلولی.

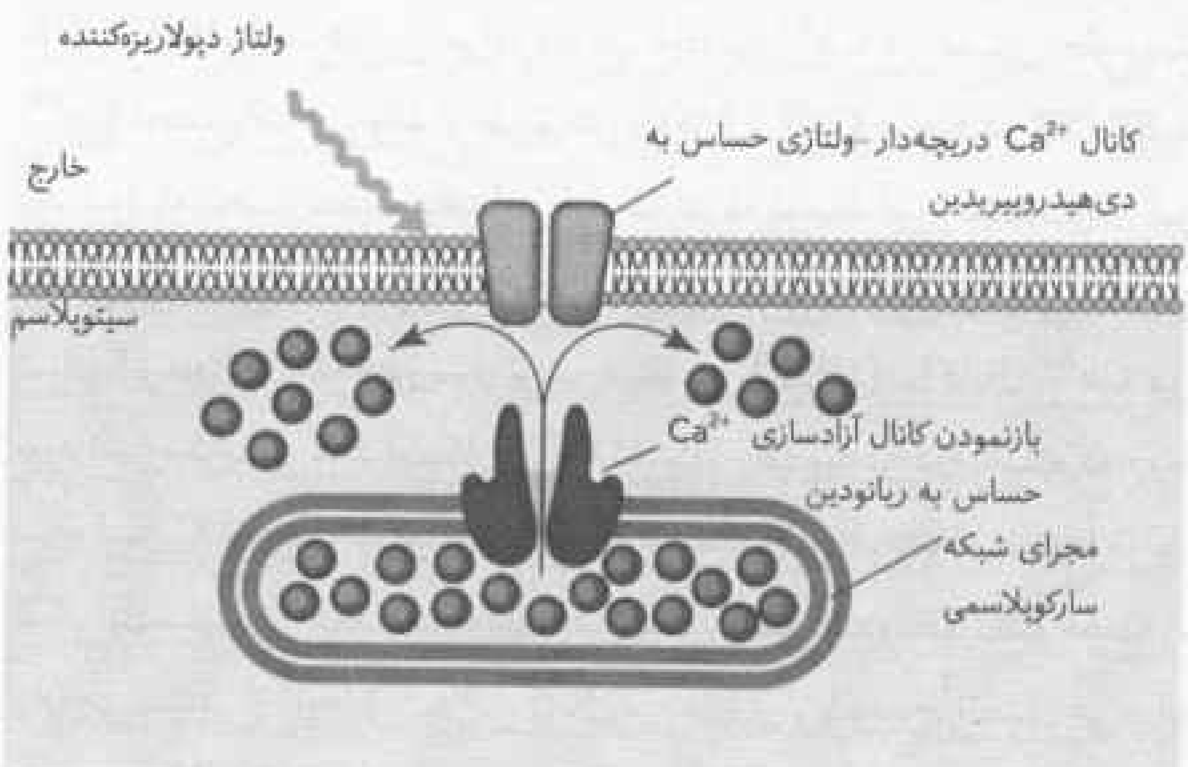
یون‌های Ca^{2+} به شکل مؤثری توسط پمپ‌های **ATPase** انتقال‌دهنده Ca^{2+}، در داخل ER (برای شبکه آندوپلاسمی یا **SR** در سلول‌های عضله) متمرکز می‌شود. این **ATPase** اجازه می‌دهد تا Ca^{2+} تا غلظت حدود ۱mM (10^{-3}M) در داخل مجرای ER/SR تغلیظ شود؛ این میزان معادل غلظت Ca^{2+} در فضای خارج‌سلولی است. این Ca^{2+} تجمع‌یافته می‌تواند از طریق دو نوع کانال Ca^{2+} موجود در ER/SR به داخل سیتوزول آزاد شود که تحت تنظیم پیام‌هایی قرار دارند که توسط انواع متعددی از گیرنده‌های سطح سلولی تولید می‌شوند. اولین مورد کانالی است که به‌شکل وسیعی بیان می‌شود و تحت عنوان **گیرنده ۱، ۴، ۵-اینوزیتول تریس‌فسفات**[1] **(IP_3R)** یا **کانال Ca^{2+} دریچه‌دار - IP_3**[2] مورد اشاره قرار می‌گیرد (شکل ۲۹-۱۳). IP_3 یک پیامبر دوم است که در هنگام تحریک فسفولیپاز C توسط هورمون‌ها یا نوروترانسمیترهای مختلف سریعاً تولید می‌شود. یک کانال آزادسازی Ca^{2+} دریچه‌دار - لیگاندی متفاوت در ER/SR عضله اسکلتی و قلبی بیان می‌شود. از آنجایی‌که این کانال بـه داروی **ریانودین**[3] اتصال می‌یابد، به آن گیرنده ریانودین (PYR) یا کانال آزادسازی Ca^{2+} حساس به ریانودین نیز می‌گویند

1. 1, 4, 5-Inositol trisphosphate receptor
2. IP_3 - gated Ca^{2+} channel
3. Ryanodine



شکل ۲۹-۱۳ به‌حرکت‌درآمدن مخازن شبکه آندوپلاسمی Ca^{2+} و فعال‌سازی پروتئین کیناز C توسط گیرنده‌هایی که هیدرولیز فسفولیپیدهای اینوزیتولی به واسطه فسفولیپاز را تحریک می‌کنند.

(شکل ۳۰-۱۳). در عضله قلب، کانال‌های RyR توسط یون‌های کلسیمی باز می‌شوند که از طریق کانال‌های Ca^{2+} دریچه‌دار - ولتاژی موجود در غشاء پلاسمایی حساس به داروهای مسدودکننده کانال، تحت عنوان دی‌هیدروپیریدین‌ها[1]، وارد سلول می‌شوند. این همکاری چندین کانال Ca^{2+} در تنظیم عملکرد عضله قلب را آزادسازی Ca^{2+} القاءشده توسط Ca^{2+} [2] گویند. در عضله اسکلتی، کانال‌های RyR از طریق تعاملات مستقیم پروتئین - پروتئین با کانال‌های Ca^{2+} دی‌هیدروپیریدین - حساس[3] باز می‌شوند؛ این تنظیم ممکن می‌باشد، زیرا SR در عضله اسکلتی تماس مستقیم با تورفتگی‌های تخصص‌یافته[4] غشاء پلاسمایی برقرار می‌کند.

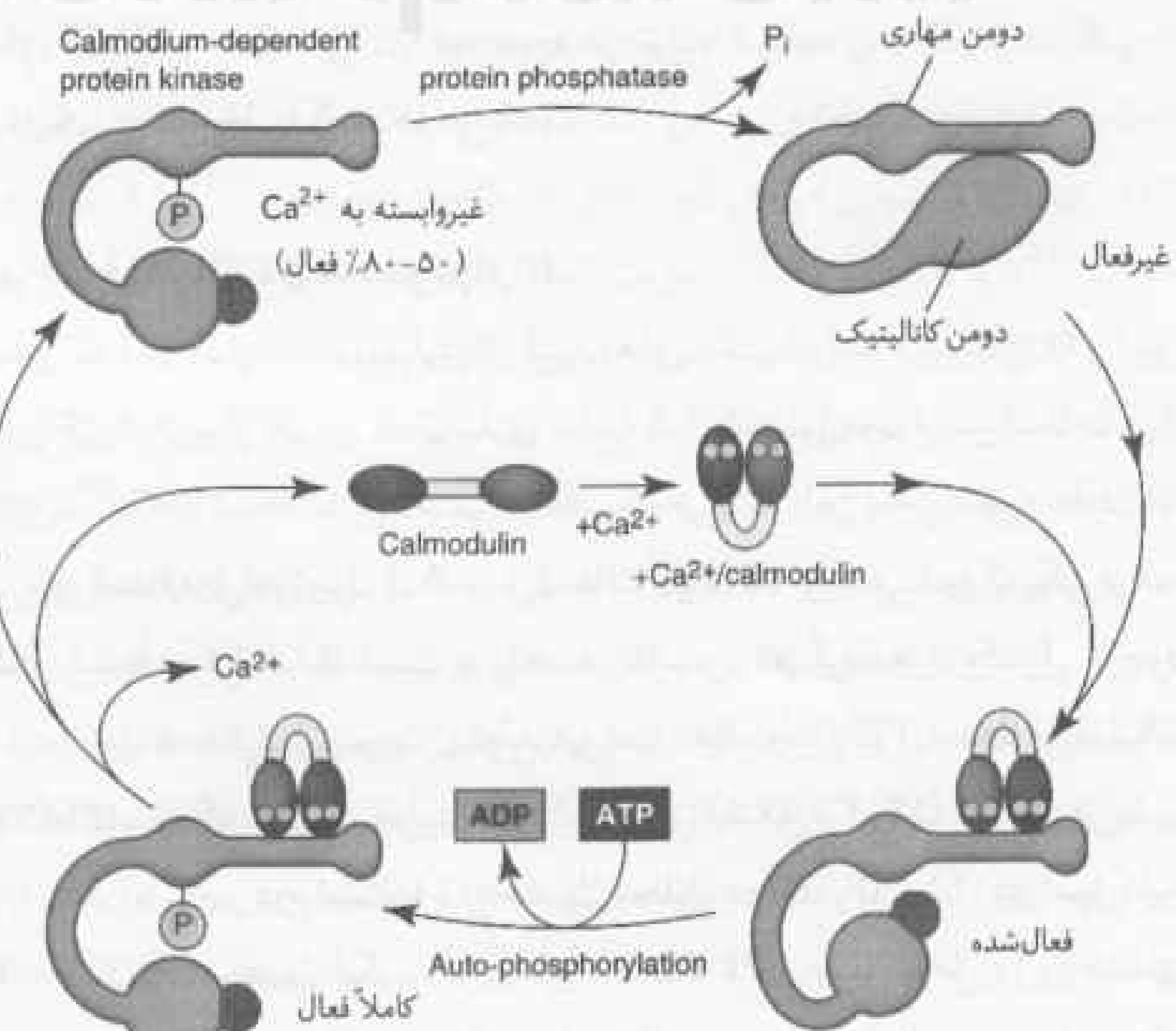


شکل ۳۰-۱۳ به‌حرکت درآمدن مخازن Ca^{2+} شبکه سارکوپلاسمی در سلول‌های عضله مخطط با فعال‌سازی کانال‌های آزادسازی Ca^{2+} حساس به ریانودین از طریق دپولاریزاسیون.

1. Dihydropyridines
2. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release
3. Ca^{2+} channels-dihydropyridin-sensitive
4. Specialized invaginations

فعال‌سازی کلسیمی پروتئین کینازها و فسفاتازهای وابسته به کالمودولین

افزایش Ca^{2+} سیتوزولی منجر به فعال‌سازی پروتئین‌های تنظیمی اتصالی کلسیم مختلف می‌شود. برخی از این پروتئین‌ها، نظیر تروپونین C که انقباض را در عضلات مخطط تنظیم می‌کند، شدیداً تخصص یافته بوده و تنها در چند بافت بیان می‌شوند (شکل ۳۵-۲۳ را ببینید). برعکس، **کالمودولین**[1] **(CaM)** (ص ۶۷۱) پروتئینی است که بیان گسترده‌ای دارد و فعالیت‌های تنظیمی Ca^{2+} را از طریق توانایی در فعال‌سازی پروتئین‌های افکتور حساس به Ca^{2+} شامل سرین/ترئونین پروتئین کینازهای اختصاصی (شکل ۳۱-۱۳)، فسفاتازها و اکسید نیتریک سنتازها (شکل ۱۷-۱۱ را ببینید)، بر دامنه وسیعی از فعالیت‌های سلولی به اجرا می‌گذارد. با اتصال Ca^{2+}، کالمودولین متحمل تغییرات کونفورماسیونی می‌شود که تعامل آن با پروتئین‌های افکتور فرودست را تسهیل می‌کند. برخی کینازهای وابسته به کالمودولین، نظیر کیناز زنجیر سبک میوزین، تنها پروتئین‌های اختصاصی را هدف می‌گیرند، در حالی که اشکال دیگر، نظیر CaM کیناز **II** چندفعالیتی می‌توانند دامنه وسیعی از سوبستراهای پروتئینی را فسفریله کنند. تغییر فعالیت این پروتئین‌ها، مکانیسم اصلی تغییر رفتار سلول از طریق افزایش Ca^{2+} می‌باشد. CaM کیناز **II** همچنین در هنگام اتصال به کالمودولین، متحمل اتوفسفریلاسیون شده و این اتوفسفریلاسیون این امکان را فراهم می‌سازد تا **CaMKII** مدت‌ها بعد از برگشت Ca^{2+} سیتوزولی به میزان



شکل ۳۱-۱۳ تنظیم کالمودولین و پروتئین کینازهای تحت تنظیم کالمودولین توسط Ca^{2+}.

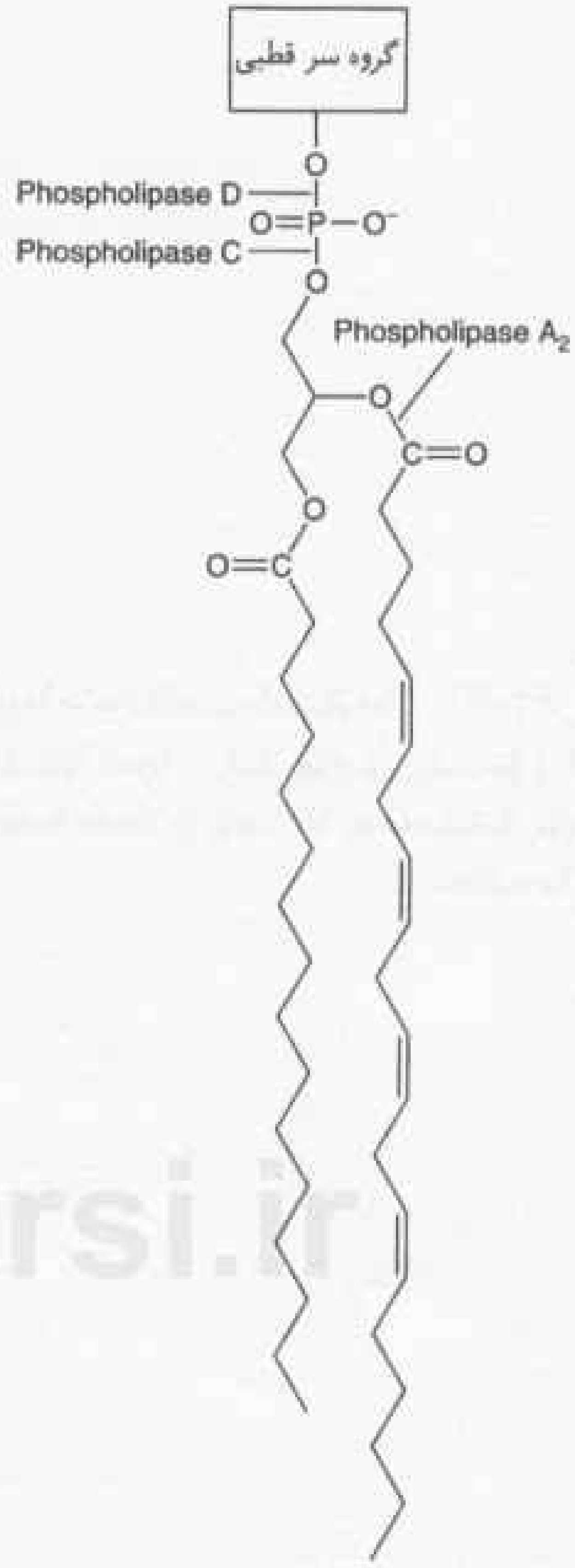
1. Calmodulin

پایه، همچنان فعال باقی بماند. CaM کینازها می‌توانند دامنه وسیعی از آنزیم‌ها، کانال‌های یونی، پروتئین‌های انقباضی و پروتئین‌های تنظیمی ژن را فسفریله و تعدیل کنند.

۱۲-۱۳ • هدایت پیام فسفولیپید- محور

متابولیسم فسفولیپیدی تنظیم‌شده به‌عنوان یک جزء مسیرهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی

هدایت پیام از طریق بسیاری از گیرنده‌های سطح سلولی مستلزم فعالیت یک یا چند فسفولیپاز است که هیدرولیز کلاس‌های مختلف فسفولیپیدها (برای مثال، فسفولیپیدهای اینوزیتولی و کولینی) راکاتالیز می‌کنند. چندین کلاس فسفولیپازها تولید محصولات متفاوتی را کاتالیز می‌کنند که به‌عنوان پیامبر دوم یا تنظیم‌کننده تولید پیامبر دوم می‌باشند (شکل ۳۲-۱۳). **فسفولیپاز C (PI-PLC)** فسفولیپیدهای اینوزیتولی را هیدرولیز و تولید **اینوزیتول فسفات‌ها** و **دی‌آسیل‌گلیسرول‌ها** به عنوان پیامبران دوم می‌کنند. فسفولیپیدهای اینوزیتولی می‌توانند توسط **فسفواینوزیتید ۳-کیناز (PI-3K)** بیشتر فسفریله شده و تولید **فسفاتیدیل اینوزیتول ۵،۴،۳- تریس‌فسفات (PIP_3)** کنند که پیامبر دوم دیگری است که در ادامه شرح داده می‌شود. **فسفولیپاز D (PLD)** دائماً فسفولیپیدهای کولینی و اتانل‌آمینی را هیدرولیز نموده و تولید **اسید فسفاتیدیک** می‌کنند که خود در ادامه توسط فسفاتیدیک اسید فسفوهیدرولازها (PAP) هیدرولیز شده و تولید دی‌آسیل‌گلیسرول می‌کند. **فسفولیپاز A2 (PLA2)** به فسفو-لیپیدهای مختلفی حمله می‌کند که نتیجه آن تولید اسیدهای چرب آزاد، نظیر اسید آراشیدونیک، و لیزو-فسفولیپیدها می‌باشد.



شکل ۳۲-۱۳ کلاس‌های اصلی فسفولیپازهای مورد استفاده در تبدیل پیام به‌واسطه گیرنده.

تنظیم فسفولیپاز C و فسفولیپاز D

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، بسیاری از گیرنده‌های جفت‌شونده با پروتئین G و تیروزین کینازهای گیرنده‌ای، از طریق فعال‌سازی تولید **۱،۴،۵-اینوزیتول تریس‌فسفات (IP_3)**، آزادسازی Ca^{2+} از شبکه آندوپلاسمی را تحریک می‌کنند. این پیامبر دوم محلول در آب از هیدرولیز **فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۴، ۵-بیس‌فسفات (PIP_2)** تولید می‌شود که یکی از فسفو-لیپیدهای نسبتاً جزئی غشاء است و با فسفریلاسیون دو گروه هیدروکسیل موجود در ریشه اینوزیتول فسفاتیدیل‌اینوزیتول تولید می‌شود. هیدرولیز PIP_2 توسط فسفولیپازهای نوع **C (PLC)** با ویژگی برای فسفولیپیدهای اینوزیتولی (شکل ۳۲-۱۳) صورت می‌پذیرد که همراه با تولید دو پیامبر دوم است: (۱) محصول محلول در آب IP_3 و (۲) **دی‌آسیل‌گلیسرول (DAG)** به‌عنوان یک محصول آبگریز. آنزیم‌های **PI-PLCβ** از طریق تعامل با زیرواحدهای α پروتئین‌های G خانواده $G_{q/11}$ یا زیرواحدهای $\beta\gamma$ خانواده G_i فعال می‌شوند. برعکس، آنزیم‌های **PI-PLCγ** توسط فسفریلاسیون تیروزین و پیوستن به تیروزین کینازهای گیرنده‌ای فعال می‌شوند. برخی تیروزین کینازهای غیرگیرنده‌ای نیز آنزیم‌های PLC را فسفریله می‌کنند.

علاوه بر IP_3، فعال‌سازی $PI\text{-}PLC\beta$ و $PI\text{-}PLC\gamma$ منجر به تجمع DAG می‌شود. هرچند، در بسیاری از سلول‌ها بزرگی میزان تولید DAG به واسطه گیرنده را به تنهایی نمی‌توان به تجزیه PIP_2 نسبت داد. با وجود اینکه هیدرولیز PIP_2 مقدار کمی DAG را طی دوره‌های کوتاه مدت تولید می‌کند، هیدرولیز فسفولیپیدهای فراوان‌تر، نظیر فسفاتیدیل‌کولین (PC)، مسئول بیشترین میزان تولید پایدار DAG می‌باشد که در پاسخ به فعال‌سازی گیرنده آغاز می‌شود. در نتیجه، هیدرولیز PC توسط PLC و **فسفولیپاز D (PLD)** تنظیم فرایندهای سلولی را وساطت می‌کند که نیاز به افزایش طولانی DAG دارند. PC-PLD و PC-PLC به‌طور غیرمستقیم طی تحریک گیرنده، توسط یک شبکه پیچیده از پیام‌های اولیه فعال می‌گردند که شامل Ca^{2+}، GTPaseهای کوچک و پروتئین کیناز C می‌باشند.

دی‌آسیل‌گلیسرول و پروتئین کیناز C

دی‌آسیل‌گلیسرول (DAG) که حاصل تجزیه PIP_2 یا PC است، به اعضاء خانواده **پروتئین کیناز C (PKC)** اتصال یافته و آنها را فعال می‌کند (شکل ۲۹-۱۳ را ببینید). PKCهای غیرفعال به‌صورت پروتئین‌های سیتوزولی محلولی وجود دارند که در آن انتهای آمینو (حاوی جایگاه‌های اتصال به DAG)، انتهای کربوکسیل (حاوی جایگاه‌های اتصالی برای سوبستراهای پروتئینی و ATP) را مخفی می‌کند. وقتی DAG در غشاء تولید می‌شود، PKC به آن اتصال یافته و این منجر به بازشدن و در معرض قرارگرفتن دومن‌های اتصال به سوبسترا و ATP این کیناز می‌شود. جایگاه‌های دیگر انتهای آمینوی موجود بر روی آنزیم‌های PKC به فسفو-لیپیدهای اسیدی اتصال یافته و پیوستن PKC به غشاء را تسهیل می‌کنند. برخی ایزوفرم‌های PKC در دومن‌های انتهای آمینوی خود حاوی جایگاه‌های اتصال به Ca^{2+} هستند به‌طوری که افزایش Ca^{2+} سیتوزولی سبب تقویت اتصال PKC به غشاءها می‌شود. فعال‌سازی آنزیم‌های PKC منجر به فسفریلاسیون سرین/ترئونین بسیاری از پروتئین‌های سوبسترا می‌شود که به نوبه خود، چندین پاسخ سلولی را آغاز می‌کنند. همانند پروتئین کینازهای وابسته به cAMP و پروتئین کینازهای وابسته به کالمودولین، ایزوزیم‌های PKC فسفریلاسیون (۱) فاکتورهای رونویسی درگیر در تنظیم بیان ژن، (۲) کانال‌ها و انتقال‌دهنده‌های یونی و (۳) انواع دیگر پروتئین کینازها، را کاتالیز می‌کنند. برخی ایزوزیم‌های PKC همچنین آبشارهای MAP کینازی مختلفی را آغاز می‌کنند که پروتئین‌های تنظیمی ژنی متعددی را تحت کنترل دارند. توانایی ایزوزیم‌های PKC در تنظیم مستقیم یا غیرمستقیم فسفریلاسیون فاکتورهای رونویسی بر نقش بحرانی PKC در تنظیم رشد، تمایز و مرگ بسیاری از سلول‌ها و بافت‌ها تأکید دارد.

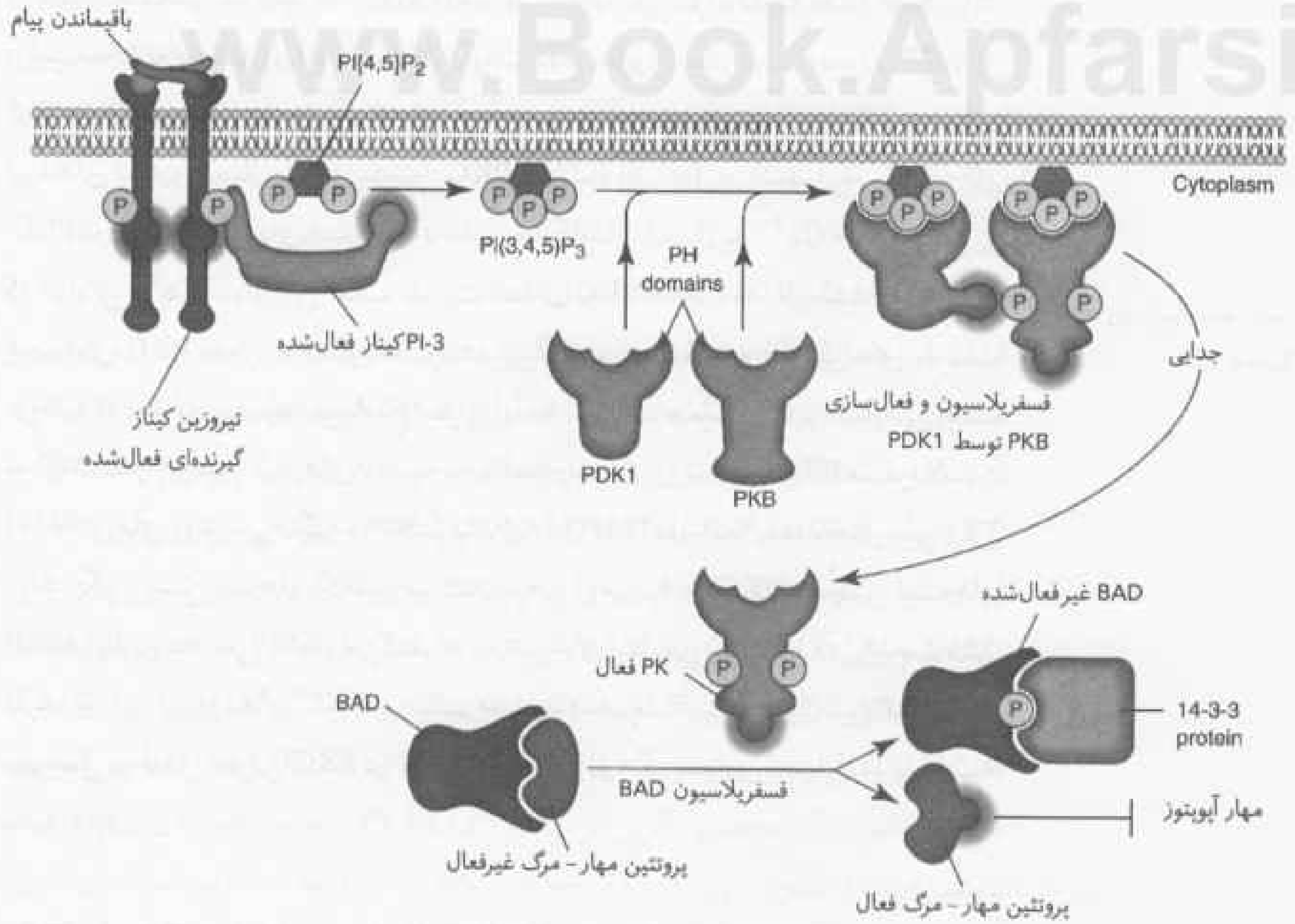
PIP_3، فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۳-کینازها و پروتئین کیناز B

فسفولیپیدهای اینوزیتولی سوبستراهایی برای لیپید اینوزیتول کینازهایی هستند که به‌طور

اختصاصی اینوزیتول را در موقعیت ′۳ – هیدروکسیل فسفریله می‌کنند. **فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کینازها (PI3-کینازها)** شامل خانواده‌ای از پروتئین‌های پیام‌رسان هستند. برخی از اینها از طریق دومن SH2 به گیرنده‌های فسفریله فاکتور رشد یا گیرنده‌های سیتوکینی فعال‌شده اتصال می‌یابند و توسط آنها فعال می‌شوند. کینازهای دیگر توسط دیمرهای $\beta\gamma$ حاصل از پروتئین‌های G فعال‌شده، فعال می‌گردند. PI-3 کینازها غالباً فسفاتیدل‌اینوزیتول ۵،۴- بیس‌فسفات را به فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۵،۴،۳- **تریس‌فسفات (PIP_3)** فسفریله می‌کنند که سوبسترایی برای PLC نیست، ولی نقش‌های مهمی را به‌عنوان پیامبر دوم در تنظیم تردد غشایی، حرکت سلولی، و فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی بقاء سلول ایفاء می‌کنند (شکل ۳۳-۱۳). خانواده **Akt/پروتئین کیناز B (PKB)** مدیاتورهای اصلی فعالیت PIP_3 هستند. PKB فعال بقاء سلولی را با سرکوب فعالیت برخی مسیرهای پیام‌رسانی مرگ سلولی تقویت نموده و سایر پروتئین‌ها و کینازهای درگیر در انتقال گلوکز و متابولیسم گلیکوژن را تنظیم می‌کند.

فسفولیپاز A_2 و تولید متابولیت‌های اسید آراشیدونیک

اشغال گیرنده‌های سطح سلولی در بسیاری از انواع سلول‌ها سبب آغاز آزادسازی **اسید**



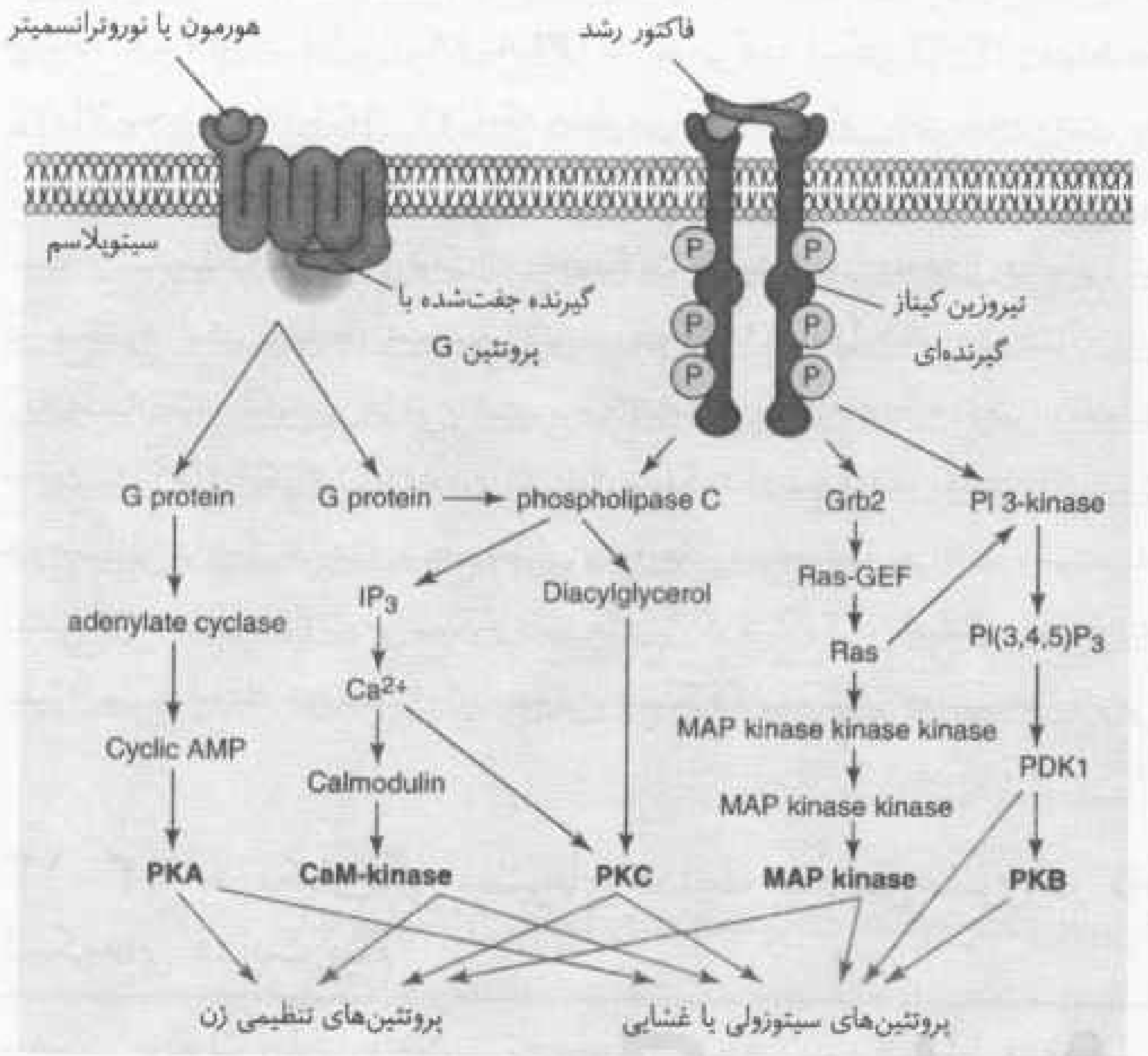
شکل ۳۳-۱۳ نقش فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز و پروتئین کیناز B در آبشارهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی تحت تنظیم ۵،۴،۳- فسفاتیدیل اینوزیتول تریس‌فسفات.

آراشیدونیک (AA) از فسفولیپیدهای غشایی می‌شود. این آزادسازی **AA** توسط اعضاء خانواده آنزیم‌های فسفولیپاز A_2 (**PLA_2**) کاتالیز می‌گردد (شکل ۳۲-۱۳ را ببینید). تنظیم PLA_2 پیچیده بوده و شامل Ca^{2+}، که به‌نظر می‌رسد جابه‌جایی برخی ایزوفرم‌های PLA_2 از سیتوزول به غشاءها را کنترل می‌کند، و همچنین فسفریلاسیون به‌واسطه کینازها می‌باشد. اسید آراشیدونیک سریعاً می‌تواند به محصولات اکسیداسیون متعددی متابولیزه شود که در مجموع **ایکوزانوئیدها** نامیده می‌شوند (ص ۹۹۴)؛ اینها شامل پروستاگلاندین‌ها، ترومبوکسان‌ها، و لکوترین‌ها می‌باشند. برخلاف سایر پیامبرهای دوم، نظیر نوکلئوتیدهای حلقوی یا Ca^{2+}، ایکوزانوئیدها عموماً از سلول تولیدکننده ترشح شده و به عنوان آگونیست‌های خارج‌سلولی برای گیرنده‌های سطح سلولی سلول‌های مجاور عمل می‌کنند. ایکوزانوئیدها در تمامی انواع سلول‌ها یافت می‌شوند و نقش‌های پاراکرین/اتوکرین اساسی را در فرایندهایی نظیر التهاب، انعقاد خون، کنترل تون عروقی، عملکرد کلیه و سایر فعالیت‌ها ایفاء می‌کنند.

۱۳-۱۳ • یکپارچگی مسیرهای هدایت پیام بین‌عضوی در داخل شبکه‌های هدایت پیام

برحسب موقعیت سلولی و شدت تخصصی‌شدن، هر کدام از سلول‌ها ممکن است به طریق ژنتیکی برای پاسخ به ملکول‌های پیام‌رسان خارج‌سلولی مختلف زیادی برنامه‌ریزی شوند. بسیاری از آبشارهای پیام‌رسانی داخل سلولی مهم می‌توانند به شکل سینرژیستیک توسط گیرنده‌هایی از انواع و خانواده‌های مختلف تنظیم شوند (شکل ۳۴-۱۳). برای مثال، مسیرهای MAP کیناز می‌توانند توسط گیرنده‌های جفت‌شونده با پروتئین G و کینازهای مربوط به گیرنده فاکتور رشد تنظیم شوند. این «تبادل اطلاعات[1]» توانایی را در سلول‌ها برای یکپارچه‌سازی پیام‌های رسیده از محرک‌های خارج‌سلولی متعدد و تبدیل آنها به الگوهای بی‌همتا و خاص پاسخ سلولی تغییریافته، به وجود می‌آورد. در موارد دیگر، کینازهایی که توسط پیامبرهای دوم مختلفی فعال شده‌اند، ممکن است ریشه‌های متفاوتی را بر روی یک پروتئین هدف مشترک، نظیر یک فاکتور رونویسی، فسفریله کنند تا تغییرات واگرا یا همگرایی را در الگوهای بیان ژن به‌وجود آورند. لذا پاسخ یکپارچه یک سلول به فعال‌سازی یک گیرنده سطح سلولی خاص اغلب براساس نوع گیرنده‌های سطح سلولی که به‌طور همزمان فعال شده‌اند، تغییر می‌کند. برای مثال، گیرنده‌ای که به‌طورطبیعی بیان ژن‌های خاصی را در یک نوع سلول خاص القاء می‌کند، ممکن است در صورت فعال‌شدن همزمان، یا در بعضی موارد عدم‌فعال‌شدن، گیرنده‌های سطح سلولی دیگر، مرگ برنامه‌ریزی‌شده همان سلول را آغاز کند. با وجود اینکه بیولوژی سلولی امروزی پیشرفت‌های قابل توجهی را در تعریف اجزاء پایه مراحل متوالی مسیرهای پیام‌رسانی خاص داشته است،

1. Cross-talk



شکل ۳۴-۱۳ تبادل اطلاعات و یکپارچگی در میان آبشارهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی اصلی تحت تنظیم گیرنده‌های سطح سلولی مختلف.

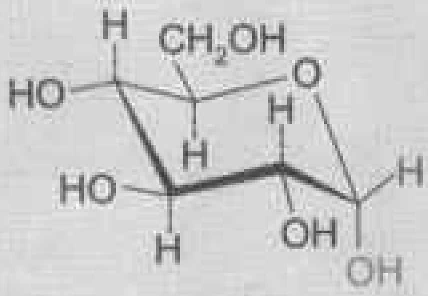
چالش بزرگی در درک نحوه یکپارچگی این مسیرهای مجزا در شبکه‌های هدایت پیام باقی مانده است.

واژه‌های کلیدی

پیام‌رسانی ژوکستاکرین
گیرنده
پیام‌رسانی آندوکرین
هورمون
مدیاتور موضعی
پیام‌رسانی پاراکرین
پیام‌رسانی اتوکرین
نوروترانسمیتر
فاکتور رشد
پیام‌رسانی سیناپسی
پیامبر دوم
آگونیست
آنتاگونیست
سیتوکین
گیرنده جفت‌شونده با پروتئین G
لیگاند
پروتئین افکتور
فسفولیپاز
فسفاتاز
قدرت
گیرنده کانال یونی دریچه‌دار - لیگاندی
گیرنده هسته‌ای
حساسیت‌زدایی گیرنده
پروتئین آداپتور
گیرنده متصل به آنزیم
گوانیلات سیکلاز
سرین /ترئونین کیناز
تیروزین کیناز
MAP کیناز
GTPase کوچک
پروتئین G هتروتریمری
آدنیلات سیکلاز
درون‌کشی گیرنده
نوکلئوتید حلقوی
فسفودی‌استراز نوکلئوتید حلقوی
کانال ورودی کلسیم
کانال آزادسازی کلسیم
کالمودولین
ایکوزانوئید
پروتئین کیناز تحت تنظیم پیامبر دوم



پیوست‌ها



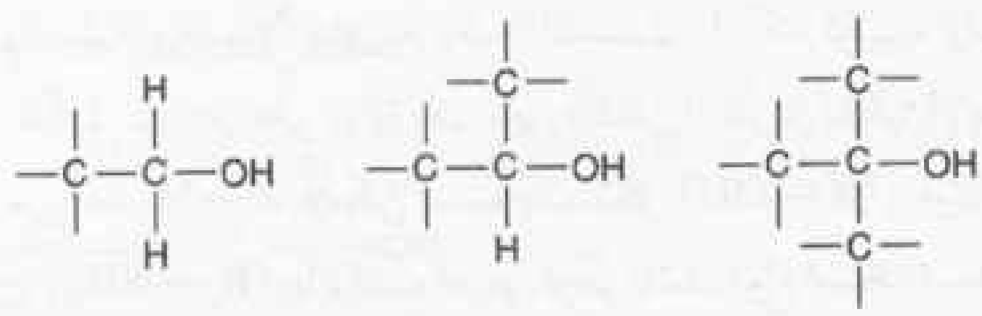
α-D-Glucose

مروری بر شیمی آلی

گروه‌های عامل

الکل‌ها

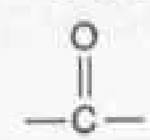
فرمول عمومی **الکل‌ها** به‌صورت R-OH می‌باشد که در آن R یک گروه آلکیل یا آریل است. برحسب اتصال کربن حاوی هیدروکسیل (OH) به یک، دو، یا سه کربن دیگر، الکل‌ها به انواع اول، دوم، یا سوم تقسیم می‌شوند.



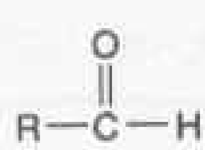
Primary　　Secondary　　Tertiary

آلدئیدها و کتون‌ها

آلدئیدها و **کتون‌ها** یک گروه کربونیل دارند:



آلدئیدها عبارتند از

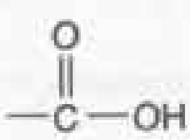


و یک کتون دو گروه (آلکیل و یا آریل) متصل به گروه کربونیل دارد.



اسیدها و انیدریدهای اسیدی

اسیدهای کربوکسیلیک گروه عامل (COOH—) را دارند.



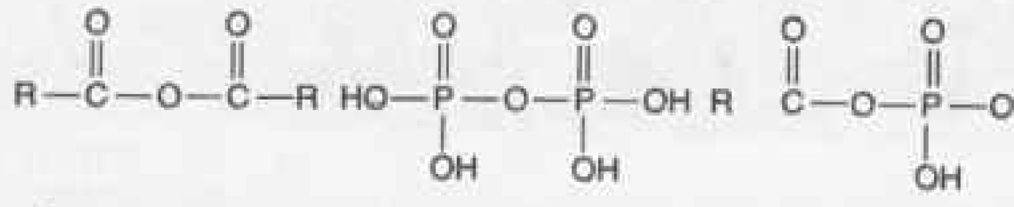
اسیدهای دی‌کربوکسیلیک و تری‌کربوکسیلیک حاوی دو و سه گروه کربوکسیل هستند. یک اسید کربوکسیلیک در آب به یون کربوکسیلات دارای بار منفی تفکیک می‌شود:



Carboxylic acid　　Carboxylate ion

اسامی اسیدهای کربوکسیلیک معمولاً به -یک و یون کربوکسیلات به - ات ختم می‌شود. **انیدریدهای اسیدی** زمانی تولید می‌شوند که دو ملکول اسید با یکدیگر واکنش کنند و یک ملکول آب از میان آنها برداشت شود. یک اسید انیدرید ممکن است بین دو اسید آلی، دو

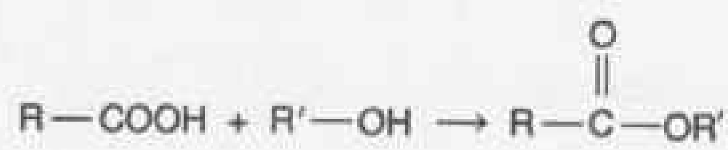
اسید معدنی و با یک اسید آلی و یک اسید معدنی به‌وجود آید.



Organic anhydride — Inorganic anhydride — Organic–Inorganic anhydride

استرها

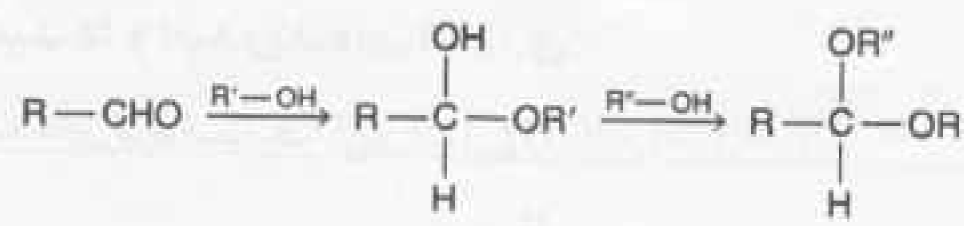
استرها در واکنشی بین یک اسید کربوکسیلیک و یک الکل تولید می‌شوند:



استرها ممکن است بین یک اسید معدنی و الکل آلی، برای مثال گلوکز ۶-فسفات، تشکیل شوند.

نیمه استال‌ها، استال‌ها و لاکتون‌ها

واکنش بین یک آلدئید و یک الکل تولید یک **نیمه‌استال** می‌کند که ممکن است با یک ملکول دیگر الکل واکنش نموده تا تولید یک **استال** کند:



Hemiacetal — Acetal

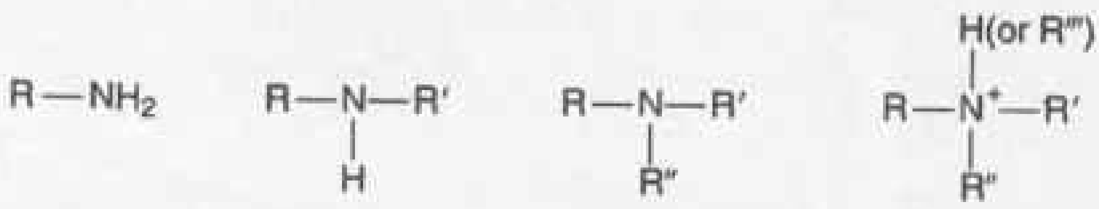
لاکتون‌ها استرهای حلقوی هستند که زمانی تولید می‌شوند که گروه‌های اسیدی و الکلی موجود بر روی یک ملکول با یکدیگر واکنش کنند و معمولاً نیاز به تولید یک حلقه پنج یا شش اتمی دارند.

ترکیبات غیراشباع

ترکیبات غیراشباع ترکیباتی با یک یا چند پیوند چندگانه کربن-کربن، نظیر پیوند دوگانه $-C=C-$، هستند.

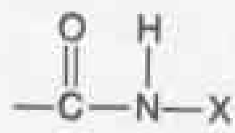
آمین‌ها و آمیدها

آمین‌ها، $R-NH_2$، مشتقات آلی NH_3 هستند و برحسب تعداد گروه آلکیل اتصال‌یافته به نیتروژن، به‌عنوان نوع اول، دوم، یا سوم نامگذاری می‌شوند. وقتی استخلاف چهارم به این نیتروژن اتصال می‌یابد، گونه تولیدی دارای بار مثبت خواهد بود و یک یون آمونیوم چهارم نامیده می‌شود:



Primary amine — Secondary amine — Tertiary amine — Quaternary ammonium ion

آمیدها حاوی گروه عامل

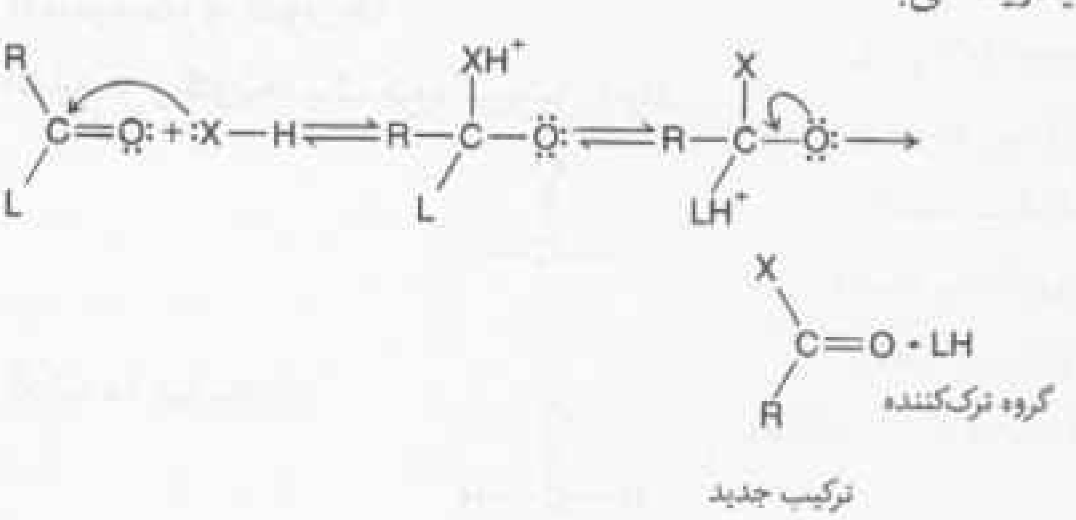


هستند که در آن X می‌تواند H (ساده) یا R (N استخلاف‌شده) باشد. گروه کربونیل مربوط به یک اسید است و N مربوط به یک آمین می‌باشد. در صورتی که هر دو این گروه‌های عامل مربوط به اسیدهای آمینه باشند، پیوند آمیدی را **پیوند پپتیدی** می‌گویند.

انواع واکنش‌ها

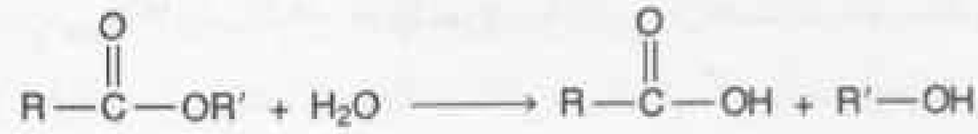
استخلاف‌های نوکلئوفیلی در یک کربن آسیل

در صورتی‌که کربن آسیل بر روی یک گروه کربوکسیلیک قرار داشته باشد، آب گروه ترک‌کننده است. استخلاف نوکلئوفیلی بر روی اسیدهای کربوکسیلیک معمولاً نیاز به یک کاتالیست یا یک ترکیب واسط واکنشگرتر دارد؛ از نظر بیولوژیکی، این واکنش از طریق کاتالیز آنزیمی رخ می‌دهد. $X-H$ ممکن است یک الکل $(R-OH)$، آمونیاک، آمین $(R-NH_2)$، یا ترکیب آسیلی دیگر باشد. انواع استخلاف‌های نوکلئوفیلی شامل استریفیکاسیون، تشکیل پیوند پپتیدی، و تولید اسید انیدرید می‌باشند.

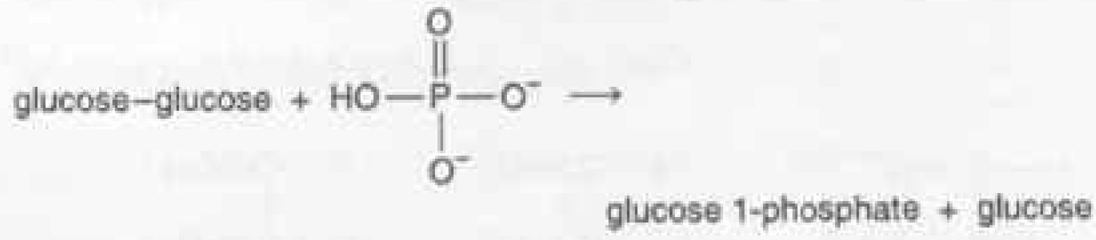


واکنش‌های هیدرولیز و فسفرولیز

هیدرولیز شکستن یک پیوند توسط آب است:



در اغلب موارد، هیدرولیز توسط اسید یا باز کاتالیز می‌شود. فسفرولیز تجزیه یک پیوند توسط فسفات معدنی است:



واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء

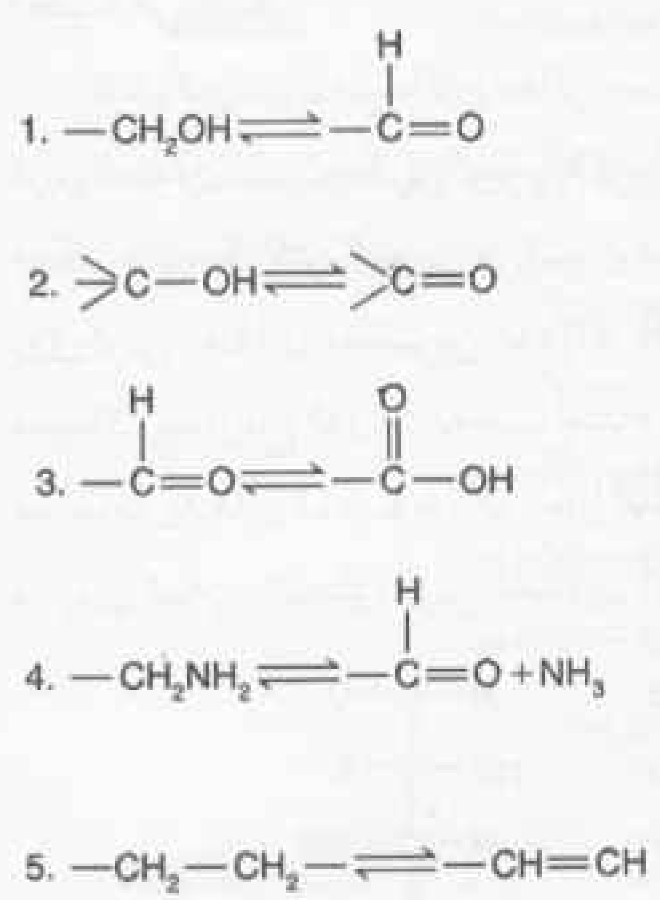
اکسیداسیون از دست دادن الکترون و **احیاء** دریافت الکترون است. نمونه‌هایی از واکنش اکسیداسیون عبارتند از:

۱. $Fe^{2+} + \text{acceptor} \rightarrow Fe^{3+} + \text{acceptor}\,.\,e^-$

۲. $\text{S(ubstrate)} + O_2 + DH_2 \rightarrow S-OH + H_2O + D$

۳. $S-H_2 + \text{acceptor} \rightarrow S + \text{acceptor}\,.\,H_2$

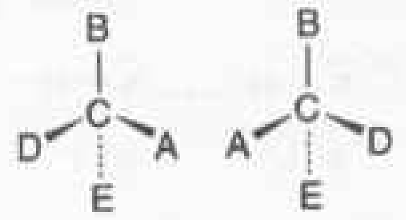
برخی از تغییرات گروه که با اکسیداسیون-احیاء رخ می‌دهند، عبارتند از:



شیمی فضایی

ایزومرهای فضایی ترکیباتی هستند که فرمول ملکولی و ترتیب اتصال اتمی یکسانی دارند، ولی از نظر آرایش این اتم‌ها در فضا متفاوت هستند.

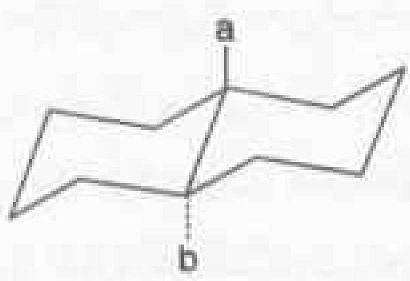
انانتیومرها ایزومرهای فضایی هستند که در آنها ایزومر تصویر آینه‌ای است و نیاز به وجود یک اتم کایرال[1] دارد. یک کربن کایرال (کربن نامتقارن[2] نیز نامیده می‌شود) کربنی است که به چهار گروه متفاوت متصل می‌باشد:



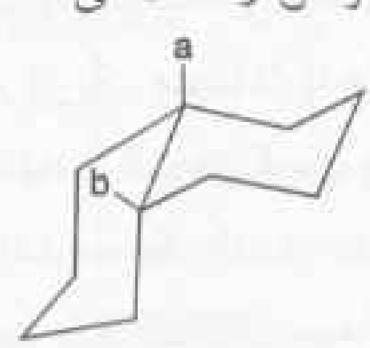
انانتیومرها با استفاده از علائم D و L یا R و S از یکدیگر تمایز داده می‌شوند. حداکثر تعداد ایزومرهای فضایی ممکن برابر 2^n می‌باشد که در آن n تعداد اتم‌های کربن کایرال است. در صورت وجود نقطه یا صفحه تقارن، یک ملکول با بیش از یک مرکز کایرال از نوع غیرکایرال خواهد بود.

دیاسترومرها ایزومرهای فضایی هستند که تصاویر آینه‌ای یکدیگر نیستند و نیازی به داشتن اتم‌های کایرال ندارند. **اپیمرها** دیاسترومرهایی هستند که بیش از یک کربن کایرال دارند و از نظر کونفیگوراسیون حول فقط یک کربن نامتقارن با یکدیگر اختلاف دارند.

آنومرها یک شکل اختصاصی اپیمرهای کربوهیدراتی هستند که در آنها تفاوت به‌طور اختصاصی حول کربن آنومری وجود دارد (صفحه ۱۴۹۴ را ببینید). دیاسترومرها همچنین ممکن است در ملکول‌هایی وجود داشته باشند که در آنها محدودیت چرخش حول پیوندهای کربن-کربن وجود دارد. پیوندهای دوگانه **ایزومریسم سیس- ترانس** را نشان می‌دهند. پیوند دوگانه زمانی کونفیگوراسیون سیس را دارد که دو گروه انتهایی بلندترین زنجیر مجاور حاوی پیوند دوگانه در یک سمت باشند و در حالت ترانس این دو انتها در دو سمت مخالف قرار دارند. سیستم‌های حلقوی متصل به یکدیگر، نظیر انواعی که در استروئیدها یافت می‌شوند (صفحه ۱۵۰۰ را ببینید)، نیز ایزومریسم سیس- ترانس را نشان می‌دهند.



trans Rings



cis Rings

1. Chiral 2. Asymmetric

انواع نیروهایی که در ساختمان‌های ماکروملکولی نقش دارند

یک پیوند **هیدروژنی** یک جاذبه دوقطبی-دوقطبی بین یک اتم هیدروژن و یک اتم الکترونگاتیو و یک جفت الکترون غیرپیوندی در اتم الکترونگاتیو دیگر است:

$$:\ddot{X}—H.......:\ddot{X}—H$$
$$\delta^-\ \delta^+ \qquad \delta^-\ \delta^+$$

پیوندهای هیدروژنی مهم موجود در ساختمان‌های ماکروملکولی بین دو اتم نیتروژن، دو اتم اکسیژن، یا یک اکسیژن و یک اتم نیتروژن به‌وجود می‌آیند.

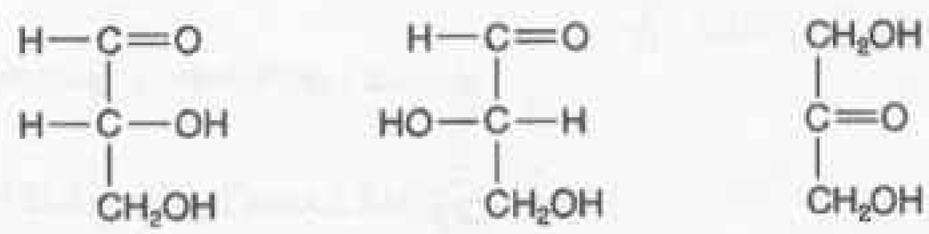
یک **تعامل آبگریز** همبستگی گروه‌های غیرقطبی در یک محیط غیرقطبی است. نیروهای واندروالس متشکل از تعاملات دوقطبی و دوقطبی القاءشده بین دو گروه غیرقطبی هستند. یک ریشه غیرقطبی که در آب حل شده است، سبب القاء ایجاد یک قشر شدیداً منظم حلال در اطراف خود می‌شود که از نظر ترمودینامیکی نامساعد است. تعامل ریشه‌های غیرقطبی با یکدیگر که همراه با دفع آب است، سبب افزایش آنتروپی سیستم می‌شود که از نظر ترمودینامیکی مساعد است.

تعاملات یونی (الکتروستاتیک) بین گروه‌های باردار وقتی این بارها مخالف هستند از نوع جاذبه می‌باشند و اگر این بارها از نوع یکسان هستند از نوع دافع می‌باشند. قدرت یک تعامل الکتروستاتیک در داخل یک ملکول پروتئین ممکن است زیاد باشد. بیشتر گروه‌های باردار موجود در سطح یک ملکول پروتئین با آب و نه با یکدیگر تعامل می‌کنند. یک **پیوند دی‌سولفیدی** (S—S) پیوند کووالانی است که در اثر اکسیداسیون دو گروه سولفیدریل (SH) به‌وجود می‌آید.

کربوهیدرات‌ها

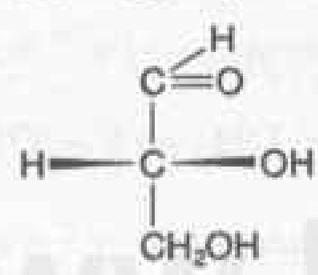
کربوهیدرات‌ها پلی‌هیدروکسی آلدئیدها یا کتون‌ها یا مشتقات آنها هستند. **منوساکارید** (قندهای ساده) کربوهیدرات‌هایی هستند که به ترکیبات ساده‌تر تجزیه نمی‌شوند. نام ژنریک منوساکاریدها شامل نوع عامل، پیشوند یونانی برای اشاره به تعداد اتم‌های کربن، و پسوند ـ وز می‌باشد؛ برای مثال، آلدوهگزوز اشاره به یک آلدئید شش کربنه و کتوپنتوز اشاره به یک کتون پنج کربنه دارد. منوساکاریدها ممکن است با یکدیگر تعامل کنند تا تولید ملکول‌های بزرگتر نمایند. وقتی کمتر از هشت منوساکارید وجود دارد، ممکن است از یک پیشوند یونانی برای اشاره به تعداد و یا از واژه عمومی **اولیگوساکارید** استفاده شود. **پلی‌ساکارید** اشاره به پلیمری با بیش از هشت منوساکارید دارد. اولیگو- و پلی‌ساکاریدها ممکن است همگن یا مخلوط باشند.

اکثر منوساکاریدها نامتقارن هستند که موضوع مهمی است، زیرا آنزیم‌ها معمولاً فقط با یک شکل ایزومری کار می‌کنند. ساده‌ترین کربوهیدرات‌ها گلیسرآلدئید و دی‌هیدروکسی‌استن هستند که ساختمان آنها به‌صورت امتدادهای فیشری[1] زیر است:



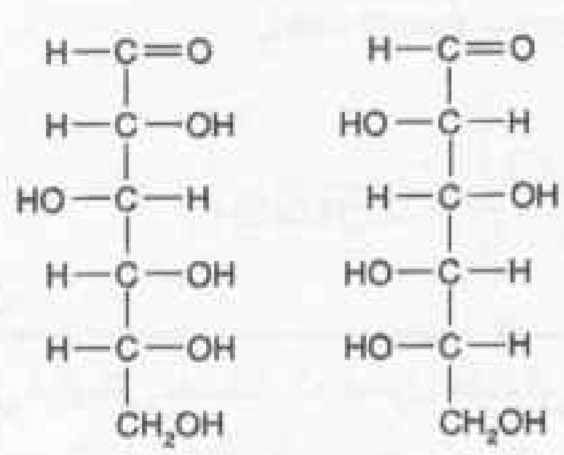
D-Glyceraldehyde L-Glyceraldehyde Dihydroxyacetone

D-گلیسرآلدئید ممکن است به‌صورت زیر نمایش داده شود:



در سیستم چان-اینگولد-پرلوگ[2] علائم شامل (R) (راست) و (S) (چپ) می‌باشند.

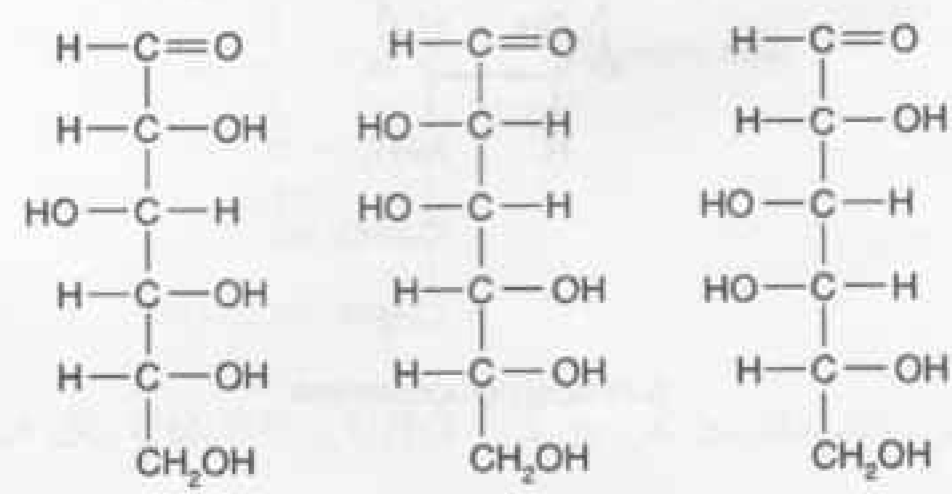
کونفیگوراسیون منوساکاریدها برحسب شیمی فضایی در دورترین کربن نامتقارن نسبت به کربن کربونیل (کربن ۱ در یک آلدئید؛ کمترین عدد ممکن برای یک کتون) تعیین می‌شود. برحسب موقعیت OH موجود بر روی کربن نامتقارن با بیشترین عدد، اگر OH به راست امتداد یافته باشد منوساکارید از نوع D و اگر به چپ امتداد یافته باشد از نوع L می‌باشد. منوساکاریدهای D و L با یک نام را **انانتیومر** گویند، و استخلاف‌ها بر روی تمامی اتم‌های کربن نامتقارن آنها معکوس می‌باشد مثل:



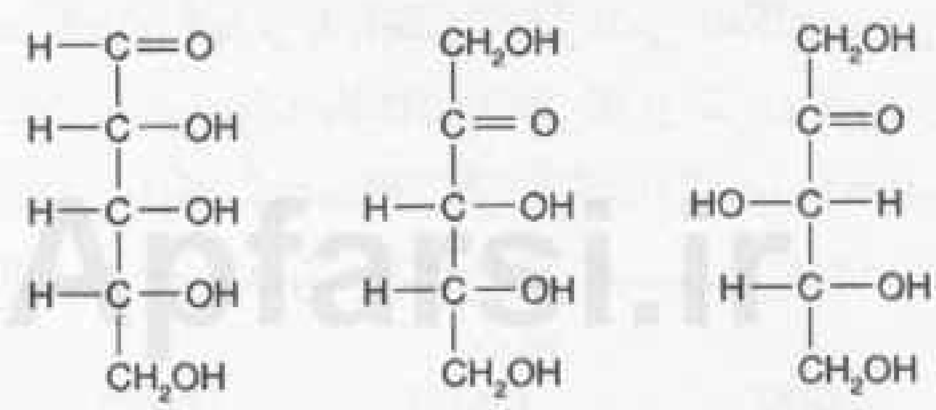
D-Glucose L-Glucose

1. Fischer projections 2. Chan-Ingold-Perlog system

اپیمرها (برای مثال، گلوکز و مانوز) ایزومرهای فضایی هستند که از نظر کونفیگوراسیون حول فقط یک کربن نامتقارن با یکدیگر اختلاف دارند. ارتباط بین گروه‌های OH با یکدیگر منوساکارید مورد نظر را مشخص می‌کند. سه آلدوهگزوز و سه پنتوز مهم عبارتند از:

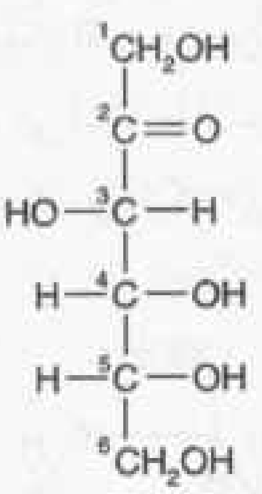


D-Glucose D-Mannose D-Galactose

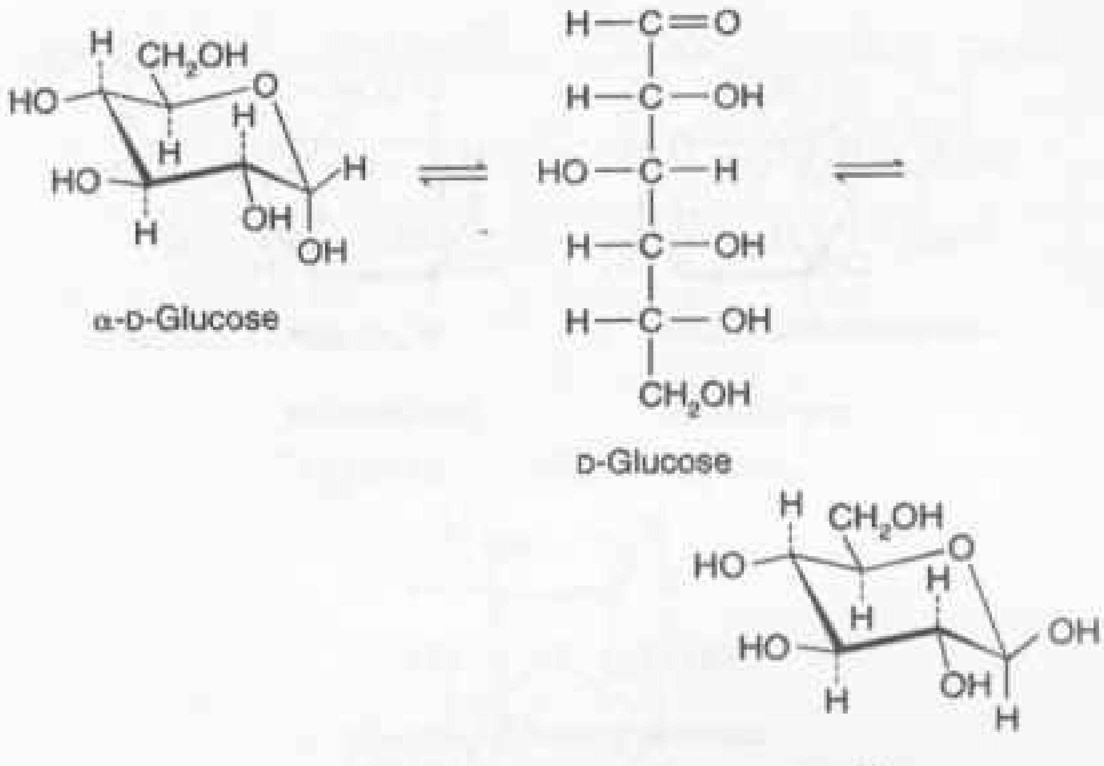


D-Ribose D-Ribulose D-Xylulose

فروکتوز کتوزی است که فقط از نظر اتم‌های کربن ۱ و ۲ با گلوکز تفاوت دارد:

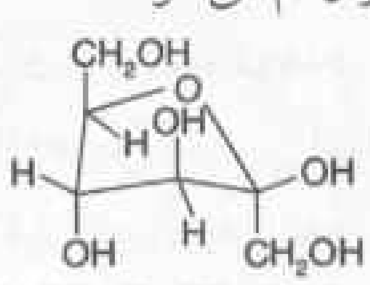


منوساکاریدهای پنج‌کربنه (پنتوزها) و شش کربنه (هگزوزها) در محلول تولید **نیمه‌استال**[1] و **نیمه‌کتال**[2] می‌کنند. یک کربن نامتقارن جدید به‌وجود می‌آید و به‌همین دلیل دو شکل ایزومری ممکن می‌باشد:



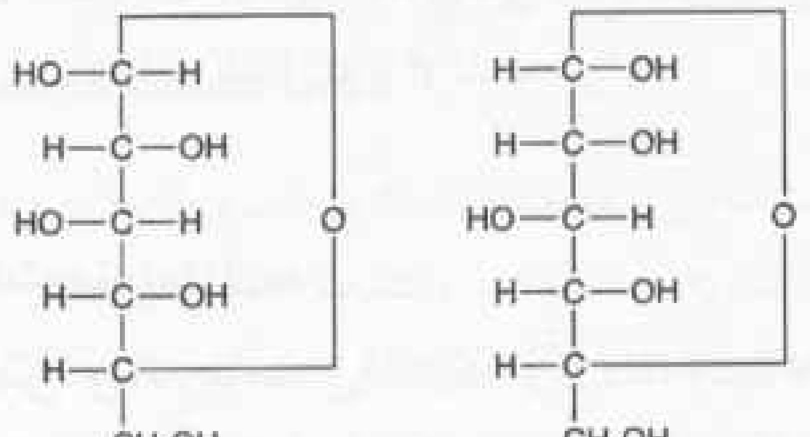
α-D-Glucose D-Glucose β-D-Glucose

تولید هر دو ساختمان پنج-اتمی (فورانوز) و شش-اتمی (پیرانوز) ممکن می‌باشد، گرچه حلقه‌های پیرانوزی معمول‌تر هستند. حلقه فورانوزی به‌صورت زیر رسم می‌شود:



β-D-Fructose

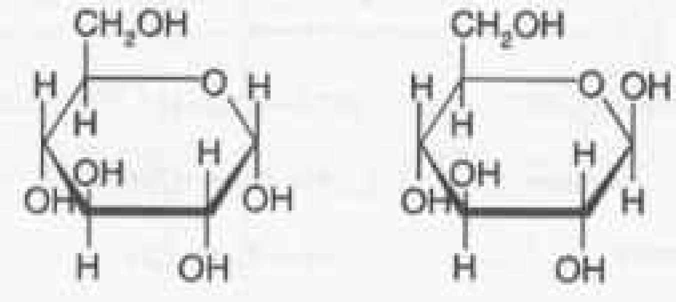
در صورتی‌که گروه OH و گروه CH_2OH موجود بر روی دو اتم کربن متصل به اکسیژن در موقعیت ترانس نسبت به‌یکدیگر قرار داشته باشند، ایزومر را α و اگر به‌صورت سیس باشند، ایزومر را β گویند. اشکال نیمه‌استالی و نیمه‌کتالی همچنین ممکن است به‌صورت فرمول‌های امتدادی فیشر رسم شوند: α در زمانی‌که OH بر روی کربن استال یا کتال به همان سمتی که حلقه قرار دارد، امتداد یابد: و β در زمانی که OH به سمت مخالف امتداد دارد.



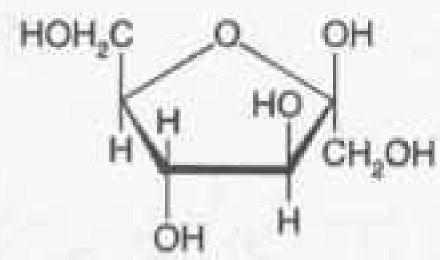
β-D-Glucose α-D-Glucose

در بیشتر مواقع از فرمول **هاورث**[3] استفاده می‌شود:

1. Hemiacetal 2. Hemiketal 3. Haworth formulas



α-D-Glucose β-D-Glucose



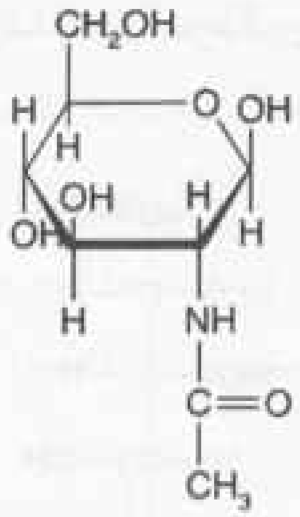
β-D-Fructose

حلقه عمود بر صفحه کاغذ است که در آن اتم اکسیژن در پشت (بالا)، C کربن ۱ به راست، و استخلاف‌ها در بالا یا زیر این صفحه حلقه رسم می‌شوند. OH موجود در کربن استال یا کتال در ایزومر α در زیر و در β در بالا قرار دارد. گروهی که در فرمول امتدادی فیشر در سمت راست رسم شده است، در فرمول هاورث پایین رسم می‌شود.

اشکال α و β یک منوساکارید اشکال فضایی اپیمرهایی تحت عنوان **آنومر** هستند که فقط از نظر کونفیگوراسیون حول کربن (استال یا کتال) با یکدیگر اختلاف دارند. منوساکاریدها اساساً در محلول به‌صورت مخلوطی از نیمه‌استال‌ها (یا نیمه کتال‌ها) وجود دارند، ولی از نظر شیمیایی به‌عنوان آلدئید یا کتون عمل می‌کنند. **موتاروتاسیون**[1] ایجاد تعادل بین اشکال α و β از طریق آلدئید یا کتون آزاد می‌باشد. استخلاف H گروه OH آنومری مانع موتاروتاسیون شده و کونفیگوراسیون را در شکل α یا β ثابت می‌کند.

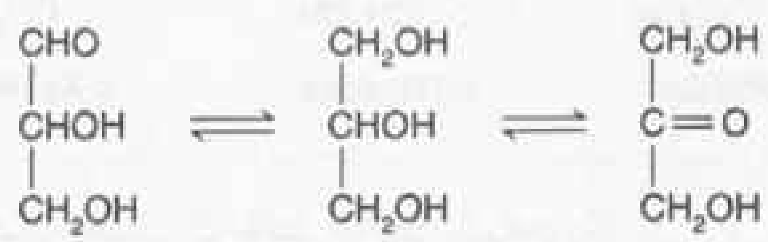
مشتقات منوساکاریدی

یک **داکسی‌منوساکارید** مشتقی است که در آن OH توسط H جایگزین شده است. در سیستم‌های بیولوژیک، این تغییر در کربن ۲ رخ می‌دهد، مگر اینکه ذکر شود. یک **منوساکارید آمینو** مشتقی است که در آن OH یا NH_2 جایگزین شده است، دوباره این تغییر در کربن ۲ صورت می‌گیرد، مگر اینکه ذکر شود. گروه آمینوی یک قند آمینو ممکن است استیله شود:

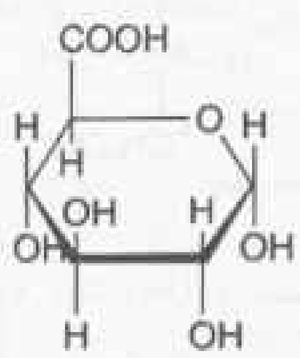


β-*N*-Acetylglucosamine

یک آلدئید و یک کتون به یک **الکل منوساکاریدی (آلدیتول)** به‌ترتیب اولیه و ثانویه احیاء می‌شود. الکل‌ها براساس نام پایه قند به‌همراه -یتول در انتهای آنها و یا به‌صورت غیرعلمی نامگذاری می‌شود (گلوسیتول = سوربیتول). منوساکاریدهایی که از نظر دو کربن از سه کربن ابتدایی با یکدیگر اختلاف دارند، یک نام آلدیتول را دارند. D-گلیسرآلدئید و دی‌هیدروکسی‌استن تولید گلیسرول می‌کنند:



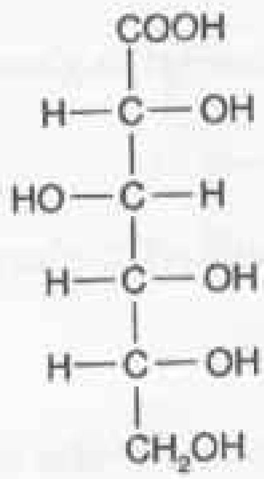
D-گلوکز و D-فورکتوز تولید D-سوربیتول می‌کنند؛ D-فروکتوز و D- مانوز تولید D-مانیتول می‌کنند. با اکسیداسیون CH_2OH (ولی نه CHO) انتهایی تولید **اسید-ورونیک** می‌شود که یک منوساکارید اسیدی است:



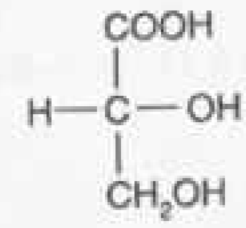
D-Glucuronic acid

1. Mutarotation

با اکسیداسیون CHO (ولی نه CH_2OH) انتهایی، تولید یک **اسید-ونیک** می‌شود:

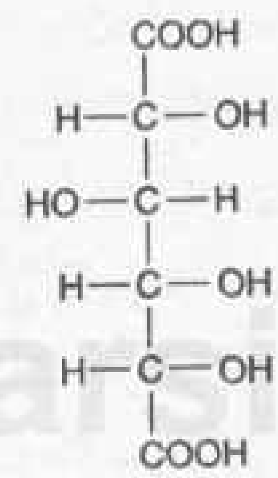


D-Gluconic acid



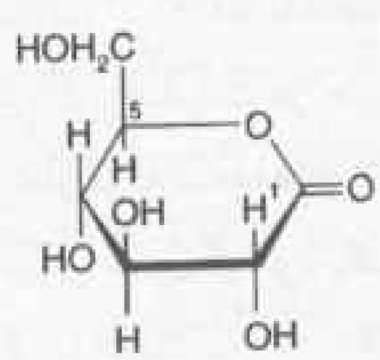
D-Glyceric acid

حاصل اکسیداسیون هر دو گروه CHO و CH_2OH یک **اسید-اریک** است:

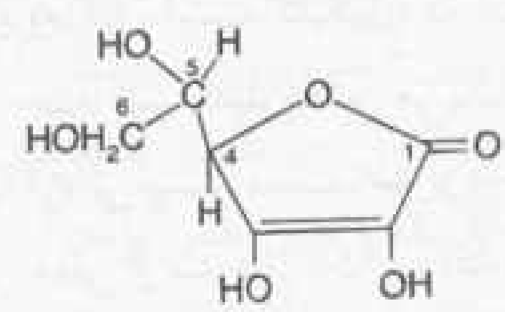


D-Glucaric acid

کتون‌ها تولید اسید نمی‌کنند. هر دو اسید-ورونیک و -ونیک می‌توانند با یک گروه OH در همان ملکول واکنش نموده و تولید **لاکتون** کنند (صفحه ۱۴۹۰ را ببینید):



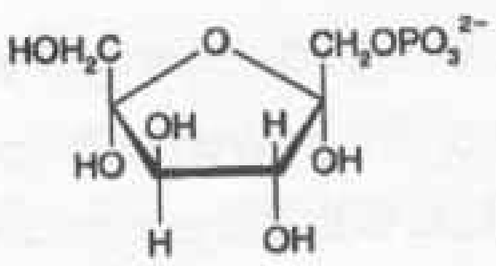
D-Glucono-5-lactone



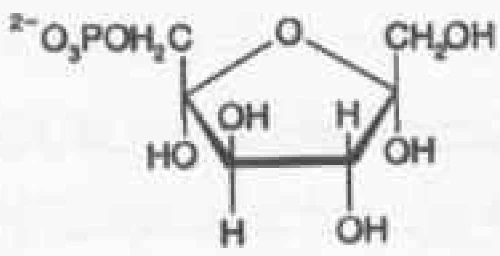
L-Ascorbic acid
(derivative of L-gulose)

واکنش‌های مربوط به منوساکاریدها

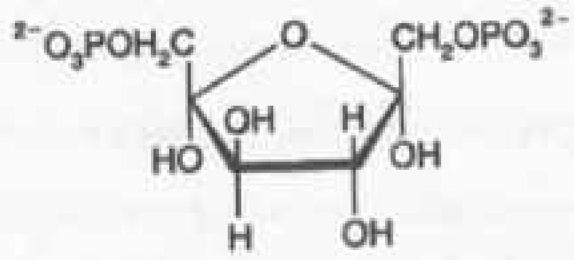
معمول‌ترین استرهای منوساکاریدها شامل استرهای فسفات در اتم‌های کربن ۱ و یا ۶ هستند:



Fructose 1-Phosphate

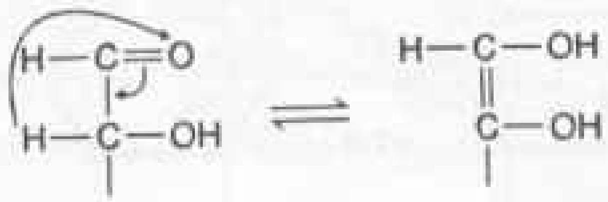


Fructose 6-Phosphate

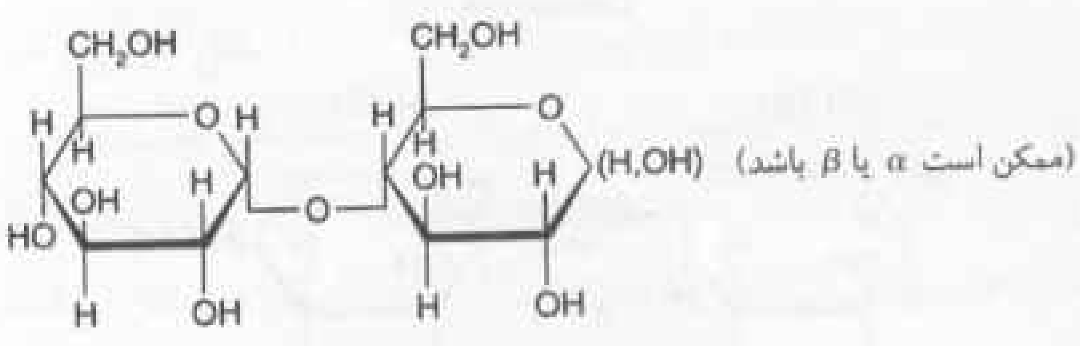


Fructose 1, 6-Bisphosphate

برای اینکه **قند احیاءکننده** باشد، لازم است امکان موتاروتاسیون وجود داشته باشد. در شرایط قلیایی، اندیول‌ها تولید می‌شوند که ممکن است به موقعیت‌های ۲، ۳ و ۳، ۴ جابه‌جا شوند:



اندیول‌ها ممکن است توسط O_2، Cu^{2+}، Ag^+، و Hg^{2+} اکسید شوند. توانایی احیاءکنندگی بیشتر اهمیت آزمایشگاهی دارد تا فیزیولوژیکی.
یک نیمه‌استال یا نیمه‌کتال ممکن است با OH منوساکارید دیگر تعامل نموده و تولید یک دی‌ساکارید (استال: گلیکوزید) کند (پایین را ببینید):

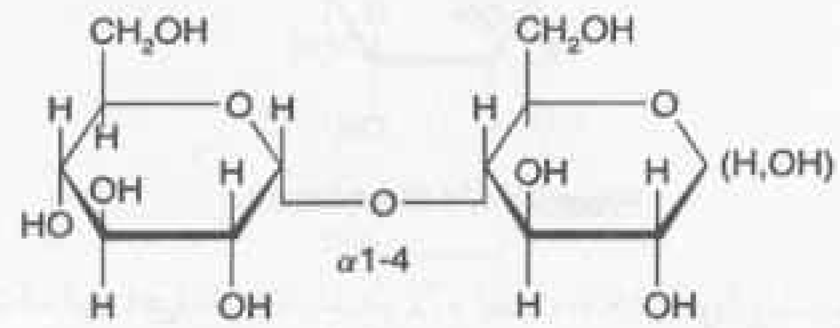


α-1,4-Glycosidic linkage

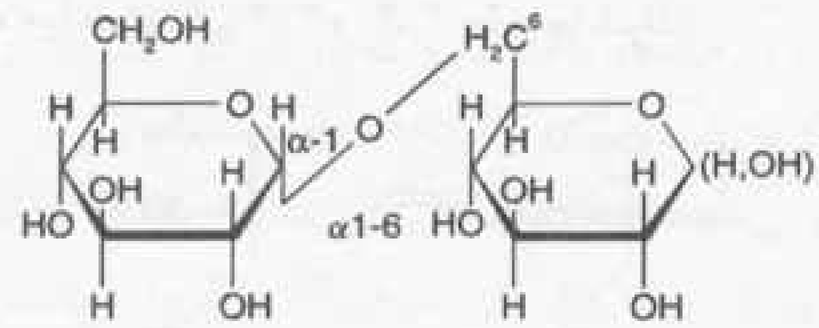
یک منوساکارید همچنان یک کربن آنومری آزاد دارد و می‌تواند بیشتر در واکنش‌ها شرکت کند. واکنش OH آنومری ممکن است با هر OH دیگری بر روی یک منوساکارید دیگر، شامل OH آنومری آن، باشد. OH آنومری که واکنش کرده است، در کونفیگوراسیون α یا β ثابت می‌شود و دیگر نمی‌تواند دچار موتاروتاسیون شود و یا احیاء کند. در صورتی‌که پیوند گلیکوزیدی بین دو اتم کربن آنومری نباشد، هنوز یکی از واحدها برای موتاروتاسیون و احیاء آزاد است.

اولیگو- و پلی‌ساکاریدها

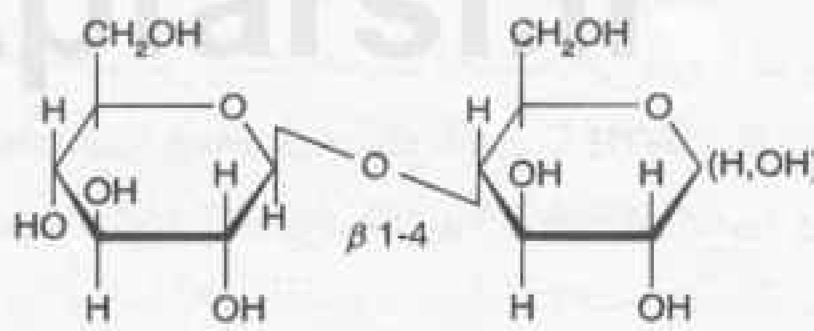
دی‌ساکاریدها دو منوساکارید با اتصال گلیکوزیدی دارند که ممکن است این منوساکاریدها یکسان و یا متفاوت باشند. در صورتی‌که اتصال گلیکوزیدی بین دو اتم کربن آنومری باشد، دی‌ساکارید غیراحیاءکننده خواهد بود:



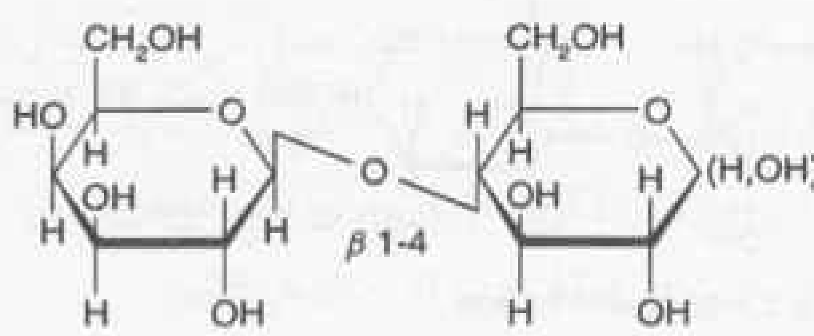
Maltose



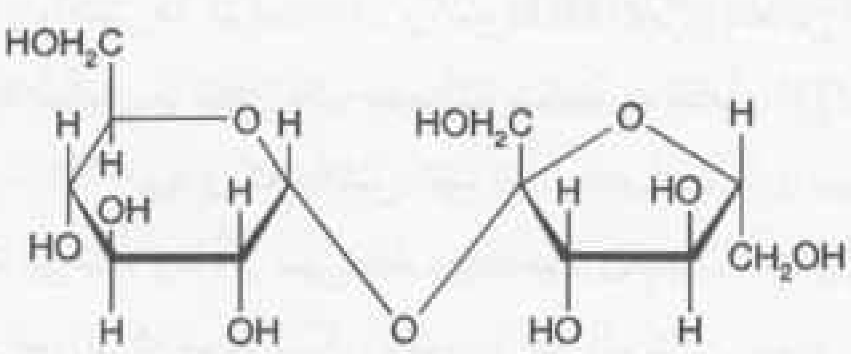
Isomaltose



Cellobiose



Lactose



α1, β2
Sucrose

Malrose = 4-*O*-(α-D-glucopyranosyl)D-glucopyranose;

احیاءکننده

Isomaltose = 6-*O*-(α-D-glucopyranosyl)D-glucopyranose;

احیاءکننده

Cellobiose = 4-*O*-(β-D-glucopyranosyl)D-glucopyranose;

احیاءکننده

Lactose = 4-*O*-(β-D-galactopyranosyl)D-glucopyranose;

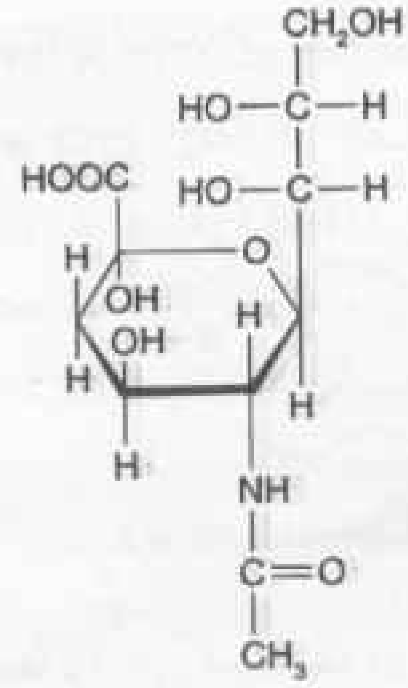
احیاءکننده

Sucrose = α-D-glucopyranosyl-β-D-fructofuranoside;

غیراحیاءکننده

هزاران منوساکارید، از یک نوع یا از انواع متفاوت، می‌توانند از طریق پیوندهای گلیکوزیدی به یکدیگر اتصال یابند تا پلی ساکاریدها[1] را تولید کنند. کربن آنومری یک واحد معمولاً به کربن ۴ یا کربن ۶ واحد بعدی اتصال می‌یابد. دو انتهای یک پلی‌ساکارید یکسان نیستند (انتهای احیاءکننده =کربن آنومری آزاد؛ انتهای غیراحیاکننده =کربن آنومری متصل به واحد بعدی؛ پلی‌ساکارید شاخه‌دار= بیش از یک انتهای غیراحیاءکننده). معمول‌ترین کربوهیدرات‌ها، شامل نشاسته، گلیکوژن و سلولز، هموپلیمرهای گلوکز هستند. نشاسته گیاهی مخلوطی از **آمیلوز**، یک پلیمر خطی واحدهای مالتوز، و **آمیلوپکتین**، شاخه‌هایی از واحدهای مالتوز تکراری (گلوکز-گلوکز با اتصالات۴، ۱- α) با اتصالات ایزومالتوز، است. **گلیکوژن** که شکل ذخیره کربوهیدرات در حیوانات است، شبیه آمیلوپکتین می‌باشد با این تفاوت که شاخه‌ها کوتاه‌تر و با فراوانی بیشتر هستند. **سلولز** موجود در دیواره سلول گیاهی، یک پلیمر خطی از سلوبیوز تکراری (گلوکز-گلوکز با اتصالات ۴، ۱- β) است. هتروپلی‌ساکاریدها بیش از یک نوع منوساکارید دارند.

موکوپلی ساکاریدها حاوی قندهای آمینو، آزاد و استیله، اسیدهای اورونیک، استرهای سولفات، و اسیدهای سیالیک علاوه‌بر منوساکاریدهای ساده هستند. **اسید N- استیل نورامینیک**، یک اسید سیالیک، است که ساختمان زیر را دارد:



لیپیدها

لیپیدها گروه متنوعی از موادشیمیایی هستند که خصوصیت مشترک آنها اساساً عدم حلالیت در آب، حلالیت در حلال‌های غیرقطبی، و وجود در بافت‌های حیوانی و گیاهی می‌باشد.

لیپیدهای قابل صابونی شدن به‌دنبال هیدرولیز قلیایی تولید املاح مربوط به اسیدهای چرب می‌کنند. آسیل گلیسرول‌ها = گلیسرول + اسیدهای چرب؛ فسفو آسیل گلیسرول‌ها = گلیسرول + اسیدهای چرب + HPO_4^{2-} + الکل؛ اسفنگولیپیدها = اسفنگوزین + اسید چرب + HPO_4^{2-} + گروه قطبی (فسفریل الکل یا کربوهیدرات)؛ موم‌ها = الکل زنجیر بلند + اسید چرب. لیپیدهای غیر قابل صابونی شدن (ترپن‌ها، استروئیدها، پروستاگلاندین‌ها، و ترکیبات مرتبط) معمولاً در معرض هیدرولیز قرار ندارند. لیپیدهای دو گانه‌دوست هم گروه «سر» قطبی و هم یک «دم» غیر قطبی دارند. ملکول‌های آمفی‌پاتیک می‌توانند امولسیون‌ها را پایدار کنند و مسئول ساختمان دولایه لیپیدی غشاءها هستند.

اسیدهای چرب اسیدهای منوکربوکسیلیک با زنجیر آلیفاتیک کوتاه (کمتر از ۶ اتم کربن)، متوسط (۸ تا ۱۴ کربن)، یا طولانی (بیش از ۱۴ اتم کربن) می‌باشند. اسیدهای چرب دارای اهمیت بیولوژیکی معمولاً ملکول‌های خطی با تعداد اتم کربن زوج (۱۶ تا ۲۰) هستند. اسیدهای چرب با استفاده از اعداد معمولی (COOH کربن ۱ است) یا الفبای یونانی (COOH حرفی را نمی‌گیرد؛ اتم‌های کربن مجاور آن به‌ترتیب عبارتند از α، β، γ، و غیره) مشخص می‌گردند. **اسیدهای چرب اشباع** فرمول عمومی $CH_3(CH_2)_nCOOH$ را دارند. (اسید پالمیتیک = ۱۶ کربن؛ اسید استئاریک = ۱۸ کربن). اینها زنجیرهای امتدادیافته دارند و در حرارت اتاق جامد هستند، مگر اینکه زنجیر کوتاه داشته باشند. برای اشاره به این ترکیبات از هر دو نام غیرعلمی و سیستماتیک (پیشوند برای اشاره به تعداد اتم‌های کربن + اسید انوئیک) استفاده می‌شود. $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ اسید پالمیتیک یا اسید هگزادکانوئیک است.

اسیدهای چرب غیراشباع یک یا چند پیوند دوگانه دارند. اکثر اسیدهای چرب موجود در طبیعت دارای پیوند دوگانه سیس هستند و معمولاً در درجه حرارت اتاق مایع می‌باشند. اسیدهای چرب دارای پیوندهای دوگانه ترانس نقطه ذوب بالاتری دارند. یک پیوند دوگانه با Δ^n نشان داده می‌شود که در آن n شماره اولین کربن پیوند دوگانه است. پالمیتولئیک = اسید Δ^{9} - هگزادکنوئیک، اولئیک = اسید Δ^{9} - اکتادکنوئیک؛ لینولئیک = اسید $\Delta^{9,12}$ - اکتادکا دی‌انوئیک؛ لینولنیک = اسید $\Delta^{9,12,15}$ - اکتادکاتری‌انوئیک؛ و آراشیدونیک = اسید $\Delta^{5,8,11,14}$ - ایکوزاتترانوئیک. از آنجایی اسیدهای چرب در داخل بدن از انتهای کربوکسیل امتداد می‌یابند، بیوشیمیدان‌ها از واژه‌شناسی متفاوتی برای اشاره به خانواده‌های اسید چرب استفاده می‌کنند: امگا (ω) منهای x (یا $n-x$) که در آن شماره اتم کربن از انتهای متیلی است که اولین پیوند دوگانه از آن شروع می‌شود. پالمیتولئیک و اولئیک از انواع اسیدهای $\omega-9$، لینولئیک و آراشیدونیک از انواع اسیدهای $\omega-3$ هستند. افزودن اتم کربن سبب تغییر خانواده‌ای نمی‌شود که اسید چرب متعلق به آن است.

از آنجایی‌که مقادیر pK اسیدهای چرب در حدود ۴ تا ۵ می‌باشد، در محلول‌های فیزیولوژیک اساساً به‌شکل یونیزه وجود دارند و نمک یا «صابون» نامیده می‌شوند. اسیدهای چرب زنجیر- بلند در آب نامحلول هستند، ولی صابون‌ها تولید میسل می‌کنند. اسیدهای چرب با الکل‌ها ایجاد استر و با کوآ ایجاد تیواستر می‌کنند.

واکنش‌های بیوشیمیایی مهم اسیدهای چرب غیراشباع عبارتند از:

۱. احیاء

$$-CH=CH- + XH_2 \rightarrow -CH_2CH_2- + X$$

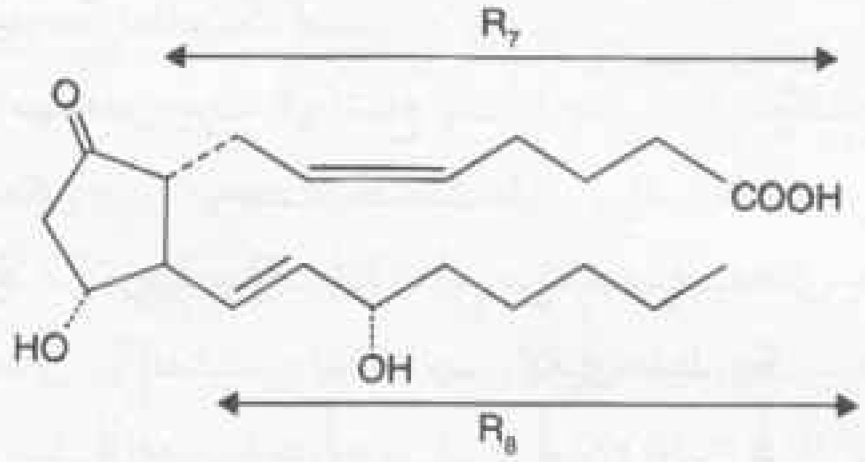
۲. افزودن آب

$$-CH=CH- + H_2O \rightarrow -CH(OH)-CH_2-$$

۳. اکسیداسیون

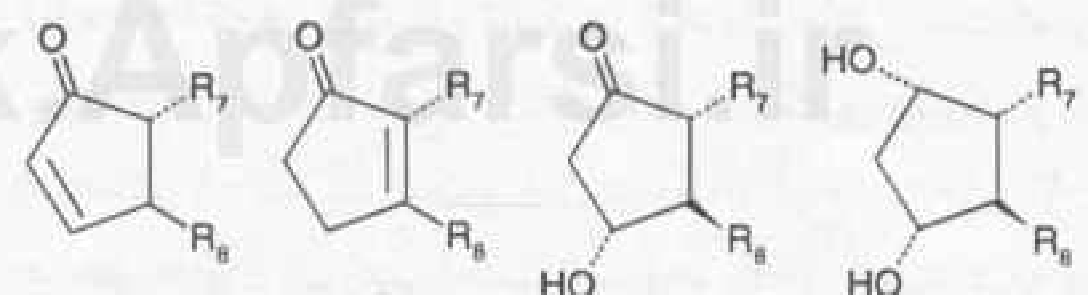
$$R-CH=CH-R' \rightarrow R-CHO + R'-CHO$$

پروستاگلاندین‌ها، ترومبوکسان‌ها، و لکوترین‌ها مشتقات اسیدهای چرب غیراشباع ۲۰ کربنه، به‌خصوص اسید آراشیدونیک، هستند. **پروستاگلاندین‌ها** ساختمان عمومی زیر را دارند:

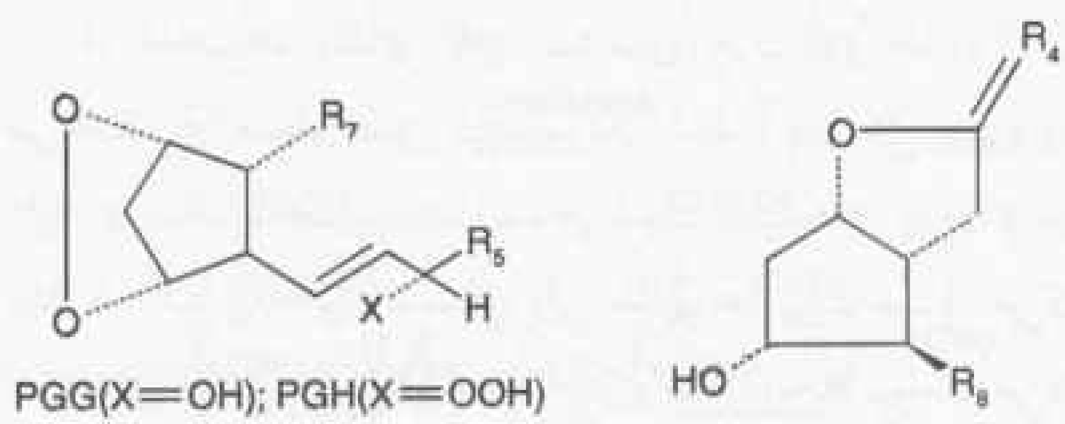


PGE_2

سری‌های مختلف از نظر استخلاف‌های موجود در حلقه و وجود گروه OH یا O،OH بر روی کربن ۱۵ با یکدیگر اختلاف دارند. عدد پایین‌نوشت اشاره به تعداد پیوندهای دوگانه موجود در زنجیرهای جانبی دارد. استخلاف‌های موجود در بالای صفحه با —(β) و انواع موجود در زیر صفحه با ---(α) نشان داده می‌شوند:

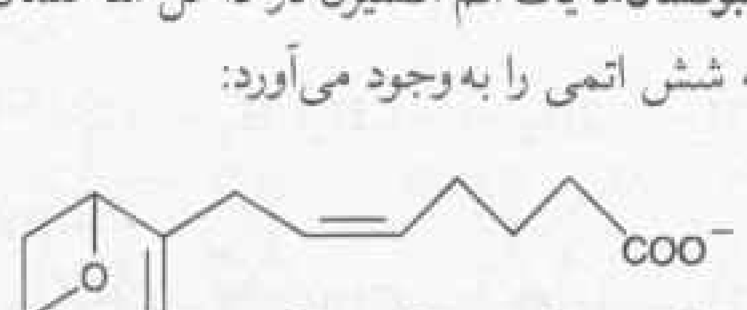


PGA PGB PGF



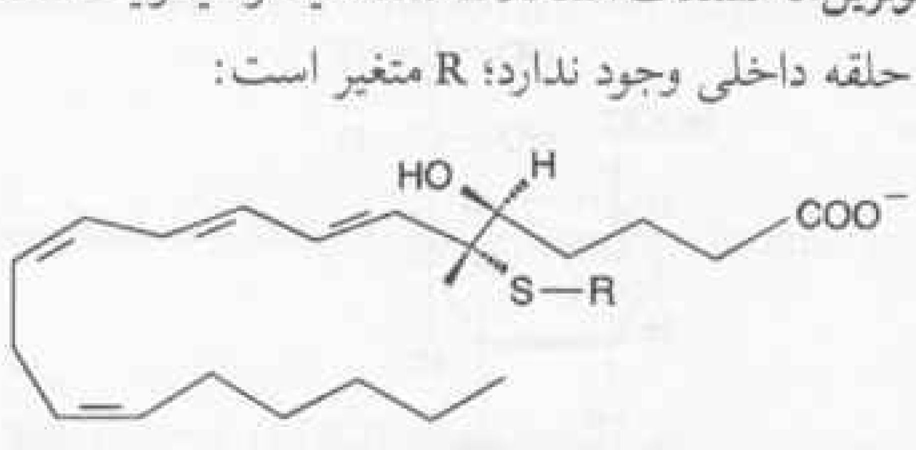
PGG(X=OH); PGH(X=OOH) PGI

در **ترومبوکسان‌ها** یک اتم اکسیژن در داخل ساختمان قرار گرفته و یک حلقه شش اتمی را به‌وجود می‌آورد:



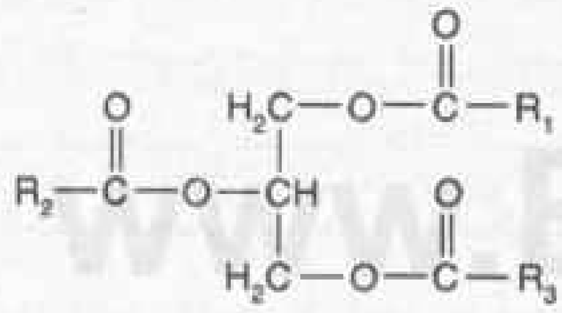
TXA_2

لکوترین‌ها مشتقات استخلاف‌شده اسید آراشیدونیک هستند که در آنها حلقه داخلی وجود ندارد؛ R متغیر است:



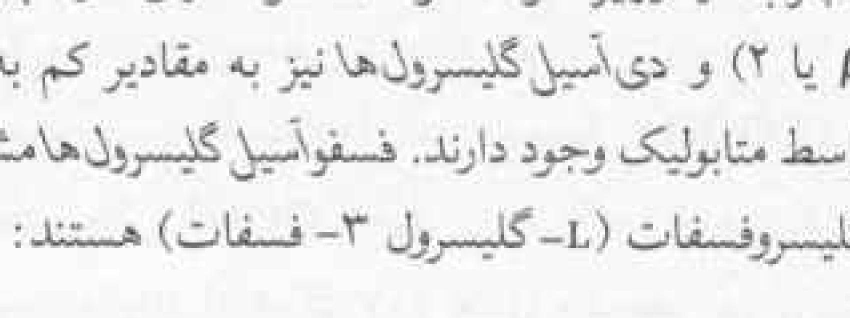
Leukotriene C, D, or E

آسیل‌گلیسرول‌ها ترکیباتی هستند که در آنها یک یا تعداد بیشتری از سه گروه هیدروکسیل گلیسرول استری شده است. در **تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها** (تری‌گلیسریدها) تمامی سه گروه هیدروکسیل به اسیدهای چرب استری شده‌اند. حداقل دو مورد از سه گروه استخلافی معمولاً متفاوت هستند. در صورتی‌که R_1 با R_3 یکی نباشد، آنگاه ملکول نامتقارن از نوع کونفیگوراسیون L خواهد بود:

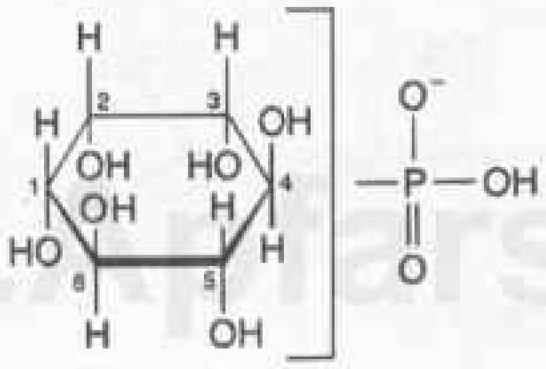


خصوصیات تری‌آسیل گلیسرول‌ها توسط اسیدهای چرب موجود در آنها تعیین می‌شود؛ در حرارت اتاق، روغن‌ها مایع (با برتری اسیدهای چرب زنجیر- کوتاه و یا غیراشباع حاوی پیوند دوگانه سیس)، و چربی‌ها جامد (با برتری اسیدهای چرب زنجیر- بلند، اشباع‌شده و یا غیراشباع با پیوند دوگانه ترانس) هستند.

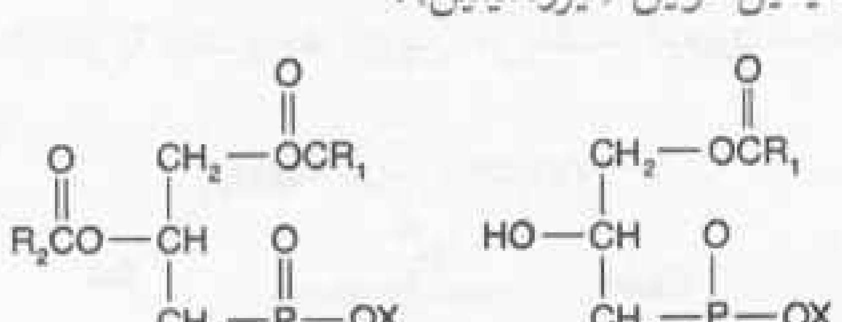
تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها آبگریز هستند و تولید میسل نمی‌کنند. این ترکیبات ممکن است توسط قلیا قوی یا آنزیم‌ها (لیپازها) به گلیسرول و سه اسیدچرب هیدرولیز شوند. منو- (معمولاً دارای اسید چرب در موقعیت β یا ۲) و دی‌آسیل گلیسرول‌ها نیز به مقادیر کم به‌عنوان ترکیبات واسط متابولیک وجود دارند. فسفوآسیل گلیسرول‌ها مشتقات L-α-گلیسروفسفات (L-گلیسرول ۳- فسفات) هستند:



در **اسید فسفاتیدیک**، به‌عنوان ترکیب پیش‌ساز (دو گروه هیدروکسیل L-α-گلیسرول فسفات با اسیدهای چرب استری‌شده است)، گروه فسفات با یک الکل (XOH) استری‌شده و چندین فسفوآسیل گلیسرول تولید می‌کند. این ملکول‌ها دوگانه‌دوست هستند، ولی‌بار خالص آنها در pH ۷٫۴ بستگی به ماهیت X — OH دارد.

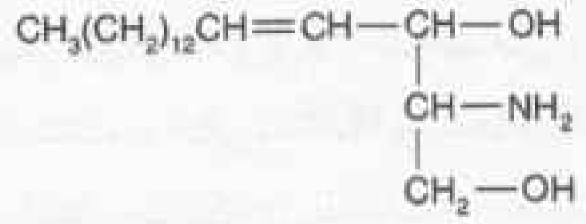
X — OH	*phasphoacylglycerol*
$HO—CH_2—CH_2—\overset{+}{N}—(CH_3)_3$	Phosphatidylcholines (lecithins)
$HO—CH_2—CH_2—\overset{+}{N}H_3$	Phosphatidylethanolamines (cephalins)
$HO—CH_2—CH(\overset{+}{N}H_3)—COO^-$	Phosphatidylserines
	Phosphatidylinositols phospate on 4, or 4 and 5

در **پلاسمالوژن‌ها**، گروه OH موجود بر روی کربن ۱ با یک اتصال اتری، به‌جای یک استری، به یک گروه آلکیل متصل می‌باشد. در صورتی‌که یک اسید چرب (معمولاً β) از فسفوآسیل‌گلیسرول هیدرولیز شود، ترکیب حاصل یک ترکیب لیزو-خواهد بود؛ برای مثال، لیزوفسفاتیدیل کولین (لیزولسیتین):

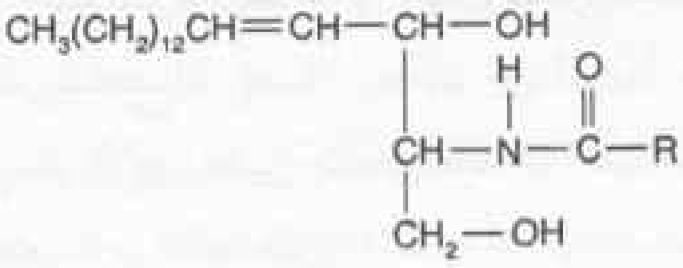


A phosphoacylglycerol A lyso-compound

اسفنگولیپیدها لیپیدهای مرکبی بر پایه الکل ۱۸ کربنه غیراشباع اسفنگوزین هستند. در سرامیدها یک اسید چرب زنجیر-بلند با اتصال آمیدی به اسفنگوزین متصل می‌باشد:

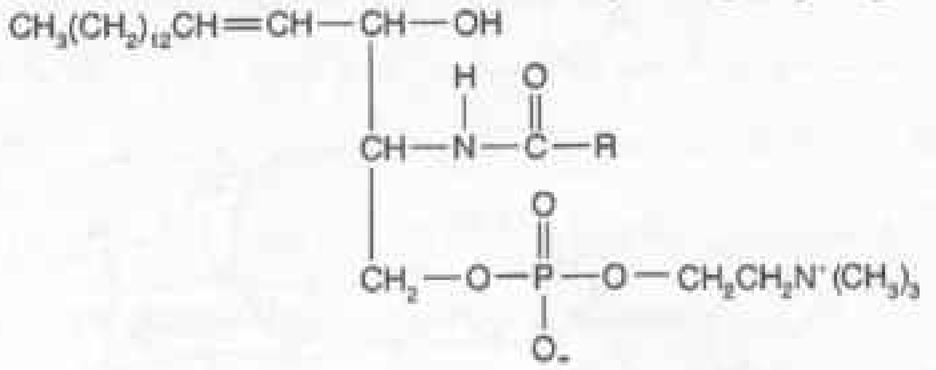


Sphingosine

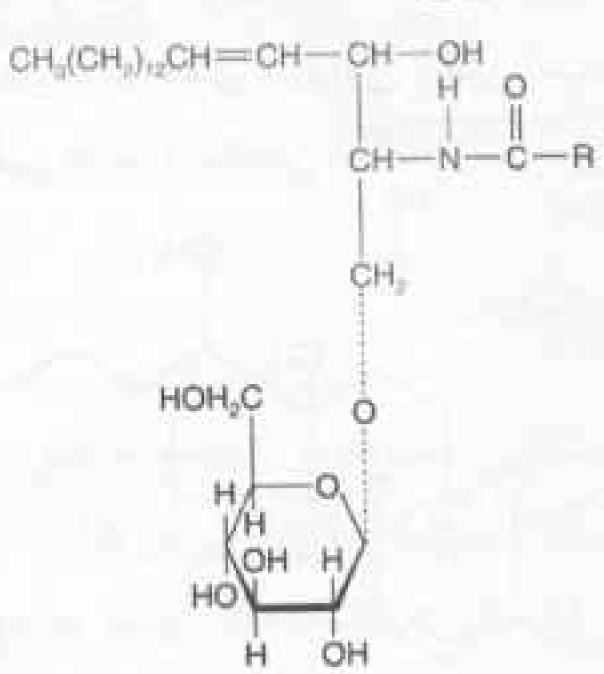


A ceramide

اسفنگومیلین‌ها به‌عنوان معمول‌ترین اسفنگولیپیدها، خانواده‌ای از ترکیبات هستند که در آنها گروه OH اولیه یک سرامید با فسفریل‌کولین (فسفریل‌اتانل‌آمین) استری شده است:



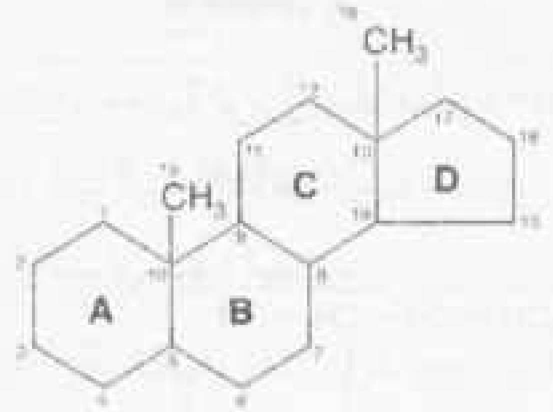
این ترکیبات ملکول‌های دوگانه‌دوستی هستند که در pH برابر ۷٫۴ به‌صورت زویتریون وجود دارند و تنها اسفنگولیپیدهای حاوی فسفر هستند. گلیکولیپیدها فاقد فسفر است، ولی به‌جای آن دارای کربوهیدارت با اتصال گلیکوزیدی به الکل نوع اول یک سرامید می‌باشند. این ترکیبات دوگانه‌دوست و به‌صورت خنثی یا اسیدی (در صورت وجود گروه اسیدی در بخش کربوهیدراتی) می‌باشند. **سربروزیدها** دارای یک گلوکز یا یک گالاکتوز متصل به سرامید هستند. سولفاتیدها گالاکتوزیل سرامیدهایی هستند که در آنها سولفات به کربن ۳ گالاکتوز استری شده است:

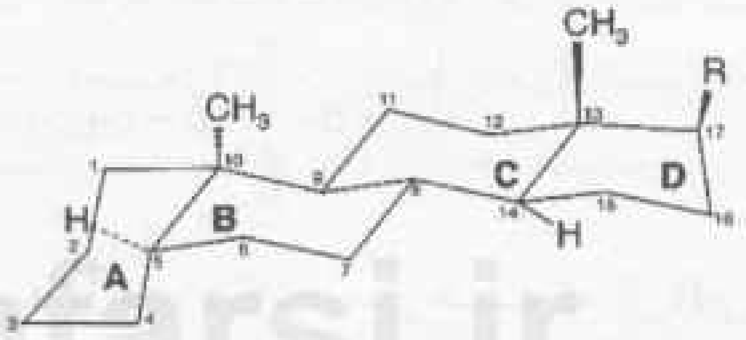


Glucosylceramide (glucocerebroside)

گلوبوزیدها (سرامید اولیگوساکاریدها) سرامیدهایی با دو یا چند منوساکارید خنثی هستند، درحالی که **گانگلیوزیدها** اولیگوساکاریدهای حاوی یک یا چند اسید سیالیک می‌باشند.

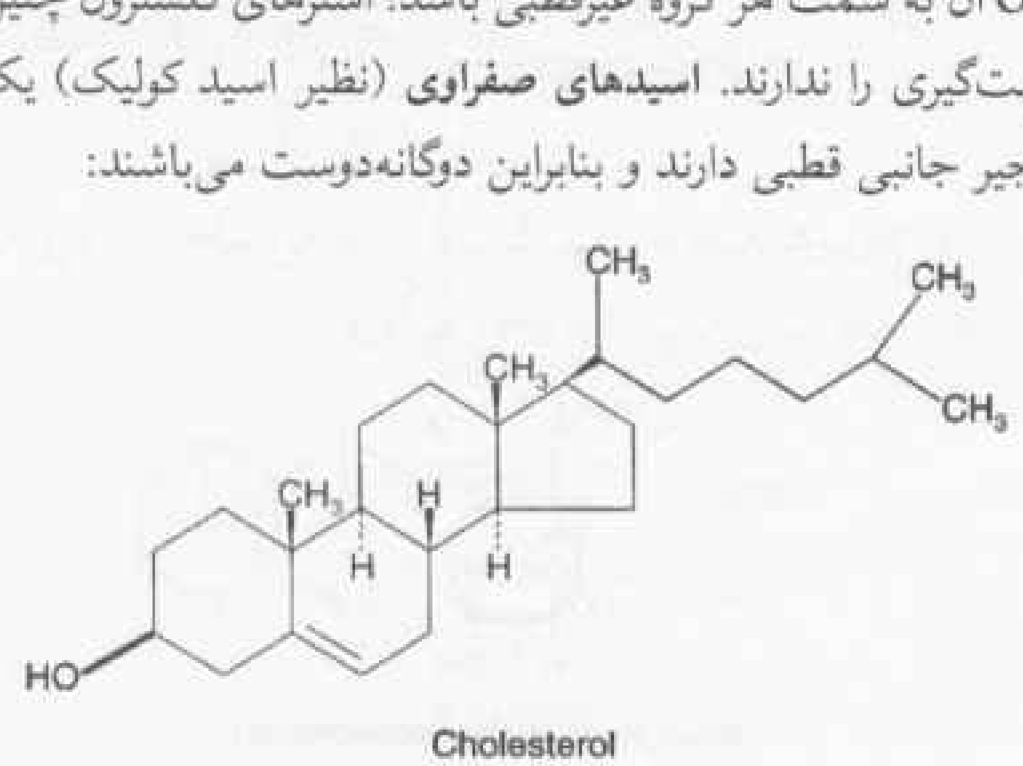
استروئیدها مشتقات سیکلوپنتانوپرهیدروفنانترن هستند. هسته استروئیدی یک ساختمان نسبتاً سخت و اساساً مسطح با استخلاف‌هایی در بالای و پایین صفحه حلقه‌ها است که به ترتیب با β (خط پیوسته) α و (نقطه‌چین) نشان داده می‌شوند:



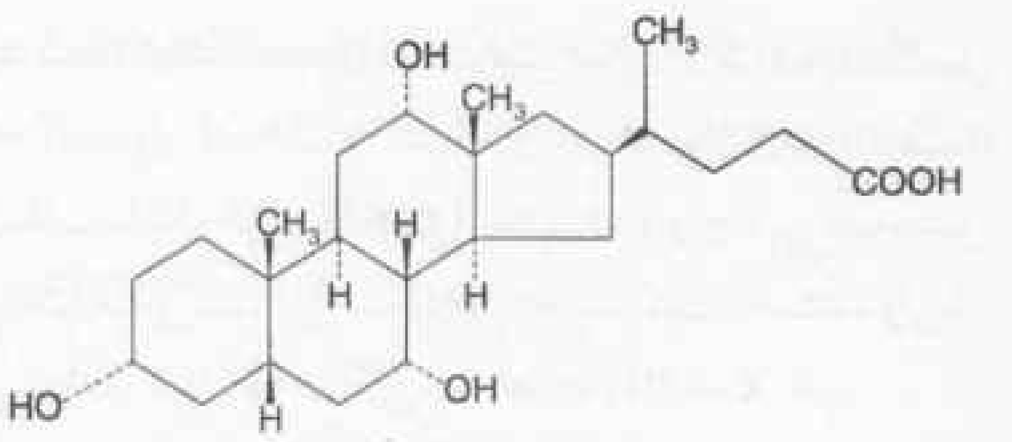


A and B rings—*cis*;
the others—*trans*

اکثر استروئیدها در انسان دارای گروه‌های متیل در موقعیت‌های ۱۰ و ۱۳ و اغلب یک زنجیر جانبی در موقعیت ۱۷ هستند. استرول‌ها یک یا چند گروه OH، به‌صورت آزاد یا به شکل استری با یک اسید چرب، دارند. اکثر استروئیدها غیرقطبی هستند. در یک لیپوزوم یا غشاء سلولی، **کلسترول** طوری جهت‌گیری می‌کند که گروه OH آن به سمت هر گروه غیرقطبی باشد؛ استرهای کلسترول چنین جهت‌گیری را ندارند. **اسیدهای صفراوی** (نظیر اسید کولیک) یک زنجیر جانبی قطبی دارند و بنابراین دوگانه‌دوست می‌باشند:

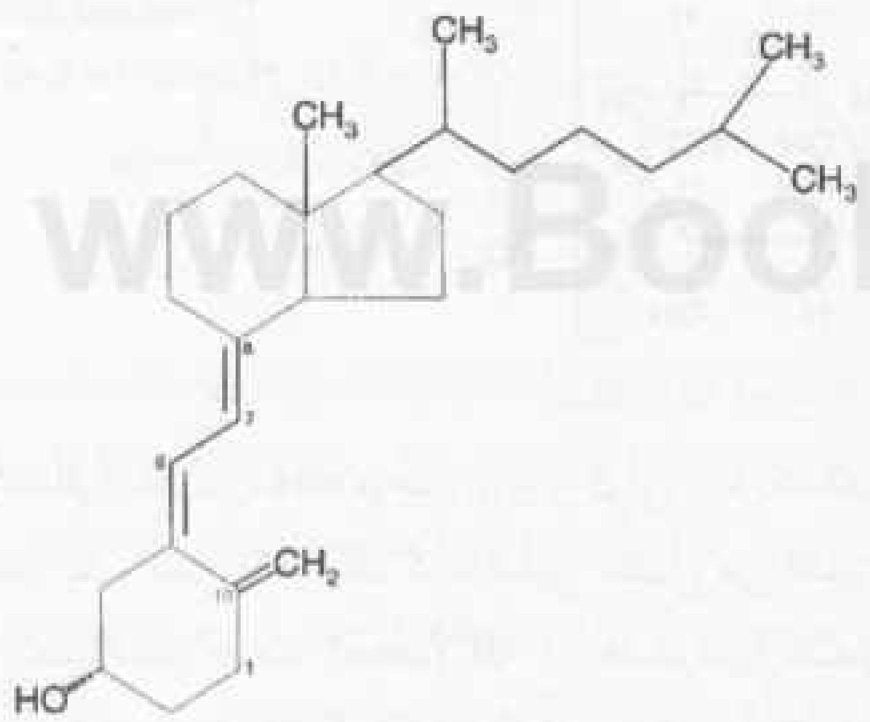


Cholesterol



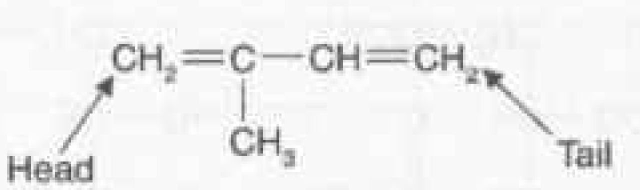
Cholic acid

هورمون‌های استروئیدی استروئیدهای اکسیژنه با ۱۸، ۱۹، یا ۲۱ کربن هستند. استروژن‌ها ۱۸ کربن و یک حلقه آروماتیک دارند و فاقد متیل متصل به کربن ۱۰ می‌باشند. آندروژن‌ها ۱۹ کربنه و بدون زنجیر جانبی گروه متصل به کربن ۱۷ می‌باشند. گلوکورتیکوئیدها و مینرالوکورتیکوئیدها ۲۱ کربن و یک زنجیر جانبی اکسیژنه ۲ کربنه متصل به کربن ۱۷ هستند. ویتامین (کله‌کلسیفرول) یک استرول نیست و مشتقی از ۷-دهیدروکلسترول در انسان است:



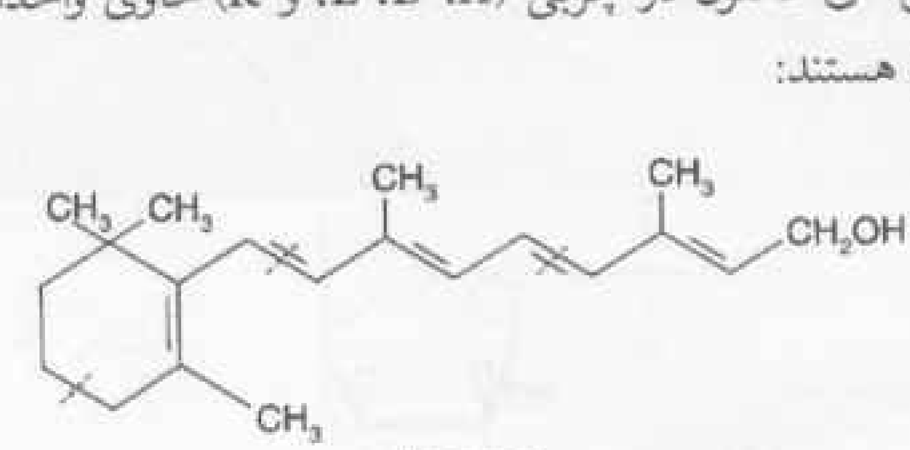
Cholecalciferol

پلیمرهایی از دو یا چند واحد ایزوپرن می‌باشند. **ایزوپرن** ساختمان زیر را دارد:

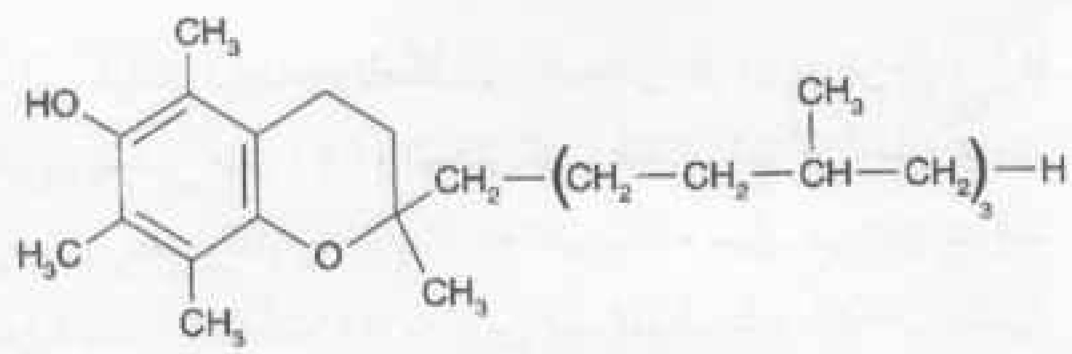


ترپن‌ها ممکن است خطی یا حلقوی هستند که در آنها ایزوپرن‌ها معمولاً به‌صورت سر به دم به یکدیگر متصل می‌شوند و اکثراً دارای پیوند دوگانه ترانس دارند (ولی ممکن است پیوند دوگانه همانند نوع موجود در ویتامین A از نوع سیس باشد). اسکوالن به‌عنوان پیش‌ساز کلسترول، یک ترپن خطی متشکل از شش واحد ایزوپرن است.

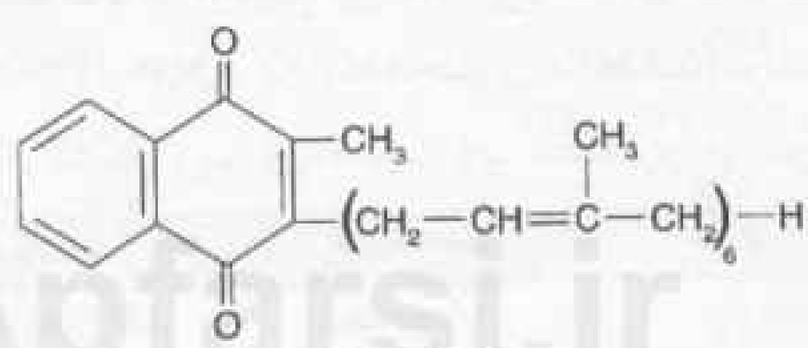
ویتامین‌های محلول در چربی (A، D، E، و K) حاوی واحدهای ایزوپرن هستند:



Vitamin A



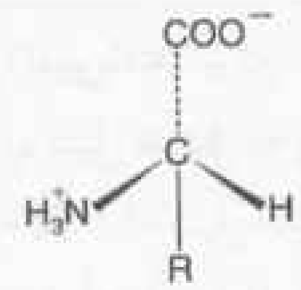
Vitamin E (α-tocopherol)



Vitamin K_2

اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه حاوی یک گروه آمینو NH_3 و یک گروه اسید کربوکسیلیک (COOH) هستند. اسیدهای آمینه‌ای که از نظر بیولوژیکی مهم می‌باشند، معمولاً α-آمینواسیدهای با فرمول زیر هستند.



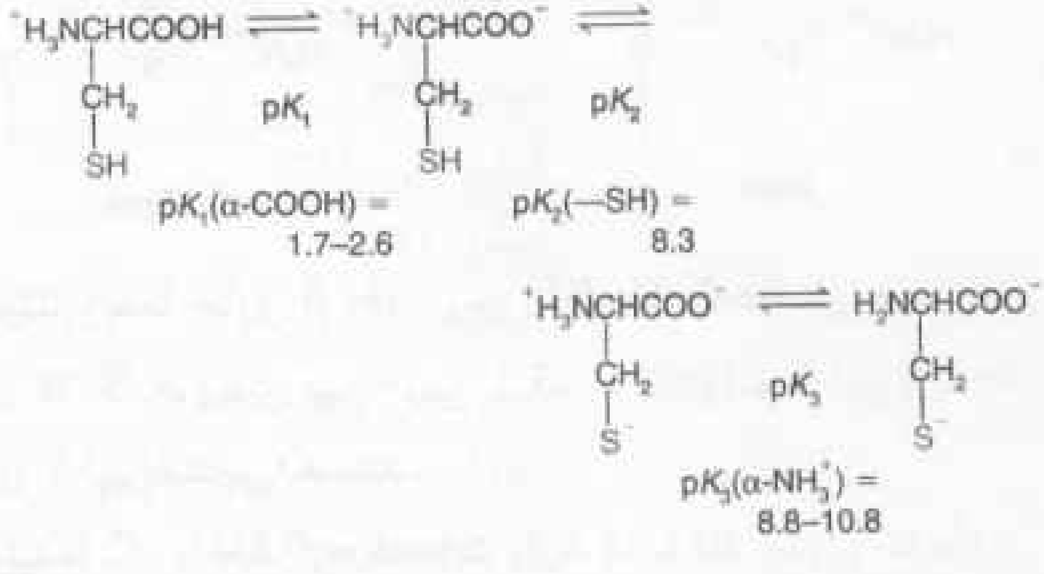
L-α-Amino acid

گروه آمینو که یک جفت الکترون غیراشتراکی دارد، بازی و دارای pK_a حدود ۹٫۵ است که در نزدیکی pH خنثی اساساً به شکل $-NH_3^+$ وجود دارد. گروه کربوکسیلیک (*pK* حدود ۲٫۳) اساساً به شکل یک یون کربوکسیلات وجود دارد. در صورتی که R هر چیزی غیر از H باشد، ملکول نامتقارن می‌باشد و معمول‌ترین اشکال موجود در طبیعت کونفیگوراسیون L (کونفیگوراسیون نسبی مشابه L-گلیسرآلدئید؛ صفحه ۱۴۹۲ را ببینید) را دارند.

قطبیت اسیدهای آمینه تحت تأثیر زنجیرهای جانبی (گروه‌های R) آنها قرار می‌گیرد (برای ساختمان‌های کامل صفحه ۱۰۴ را ببینید). اسیدهای آمینه غیرقطبی شامل انواع دارای گروه‌های بزرگ، آلیفاتیک، آرماتیک، یا سولفور تفکیک‌نشده می‌باشند (آلیفاتیک = Ala، Ile، Leu، Val؛ آروماتیک = Phe، Trp سولفور = Cys، Met). اسیدهای آمینه دارای قطبیت متوسط شامل Gly، Pro، Ser، Thr، و Tyr (تفکیک‌نشده) هستند.

اسیدهای آمینه دارای زنجیرهای جانبی قابل یونیزاسیون قطبی هستند. مقادیر pK گروه‌های جانبی آرژنین، لیزین، گلوتامات، و آسپارتات طوری است که اینها در pH فیزیولوژیک تقریباً همیشه باردار می‌باشند، در حالی که گروه‌های جانبی هیستیدین (*pK* برابر ۶٫۰) و سیستئین (*pK* برابر ۸٫۳) در pH برابر ۷٫۴ به هر دو شکل باردار و غیرباردار وجود دارند (اسیدی = Glu، Asp، Cys؛ بازی = Lys، Arg، His). با وجود این که سیستئین تفکیک‌نشده غیرقطبی است، سیستئین تفکیک‌شده قطبی می‌باشد. آسپاراژین و گلوتامین با وجود این که زنجیر جانبی بدون بار (غیریونیزه) دارند، قطبی می‌باشند.

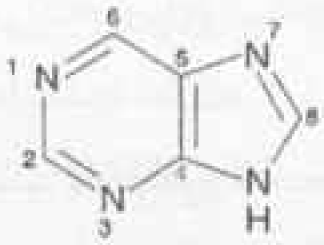
تمامی اسیدهای آمینه حداقل اسیدهای دی‌بازی هستند، زیرا حاوی هر دو گروه α-آمینو و α-کربوکسیل هستند که وضعیت یونی آنها تابعی از pH است. وجود گروه قابل یونیزاسیون دیگر سبب ایجاد یک اسید تری‌بازی نظیر سیستئین می‌شود.



شکل زویتریون شکلی است که در آن جمع خالص بارها صفر است. نقطه ایزوالکتریک متوسط دو pK درگیر در تولید شکل زویتریونی است. در مثال فوق، این میزان معادل متوسط مجموع pK_1 و pK_2 است.

نوکلئوتیدها

پورین‌ها و **پیریمیدین‌ها** که اغلب باز نامیده می‌شوند، ترکیبات هتروسیکلیک حاوی نیتروژن و با ساختمان زیر هستند:



Purine

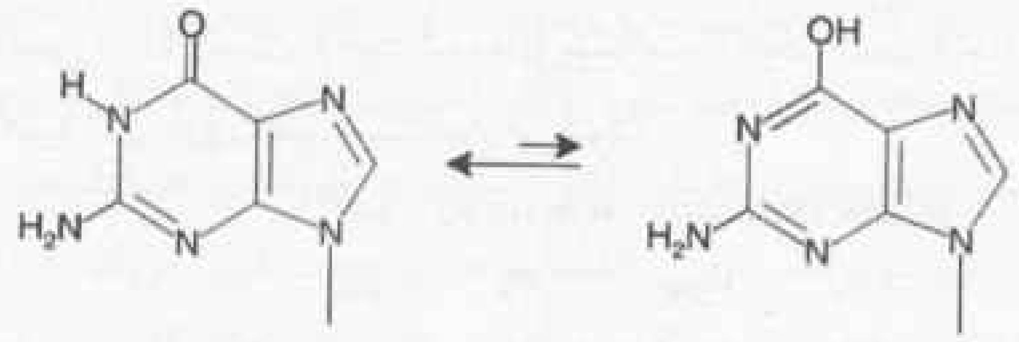


Pyrimidine

بازهای اصلی موجود در اسیدهای نوکلئیک و نوکلئوتیدهای سلولی به‌صورت زیر می‌باشند:

Purines	*Pyrimidines*
Adenine: 6-amino	Cytosine: 2-oxy, 4-amin
Guanine: 2-amino, 6-oxy	Uracil: 2,4-dioxy
	Thymine; 2,4-dioxy, 5-methyl
Other important bases fount primarily as intermediates of synthesis and/or degradation are	
Hypoxanthine: 6-oxy	Orotic acid: 2,4-dioxy, 6-carboxy
Xanthine: 2,6-dioxy	

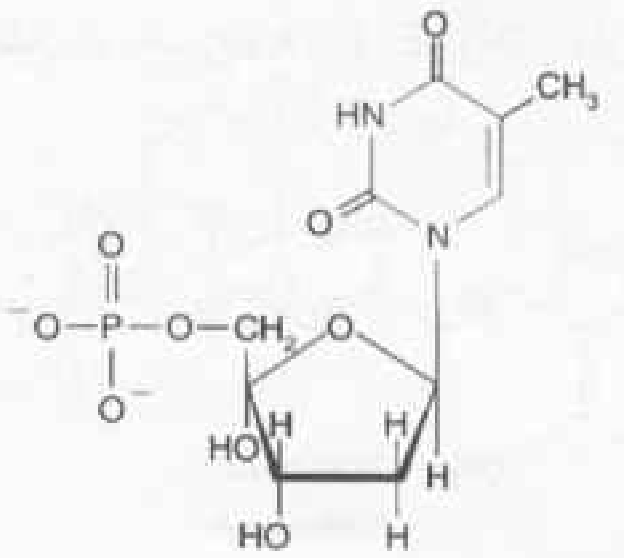
پورین‌ها و پیریمیدین‌های اکسیژنه به‌صورت ساختمان‌های توتومری وجود دارند که در آنها شکل کتو غالب است و در ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین بازها در اسیدهای نوکلئیک نقش دارند:



Keto *Enol*

نوکلئوزیدها حاوی β-D-ریبوز یا β-D-۲-داکسی ریبوز با اتصال N-گلیکوزیدی بین کربن ۱ قند و نیتروژن ۹ (پورین) یا نیتروژن ۱ (پیریمیدین) هستند.

نوکلئوتیدها یک یا چند گروه فسفات دارند که با قند استری شده‌اند. در صورتی که بیش از یک فسفات وجود داشته باشد، معمولاً از طریق پیوندهای فسفوانیدریدی به یکدیگر اتصال دارند. منوفسفات‌ها ممکن است به‌صورت باز منوفسفات و یا به‌صورت یک اسید-یلیک (AMP: اسید آدنیلیک) نمایش داده شوند.



براساس قواعد قراردادی نامگذاری، اتمهای باز در پورین‌ها از ۱ تا ۹، در پیریمیدین‌ها از ۱ تا ۶ و اتم‌های کربن قند از ′۱ تا ′۵ شماره‌گذاری می‌شوند. یک نوکلئوزید با یک نام تغییرنیافته نشان می‌دهد که قند ریبوز است و فسفات(ها) به کربن قند اتصال دارد. اشکال داکسی با پیشوند d (dAMP = اسید داکسی آدنیلیک) مشخص می‌شوند. در صورتی که فسفات به هر موقعیتی غیر ′۵ متصل باشد، لازم است مشخص گردد [′۳- AMP؛ ′5 AMP- (AMP حلقوی = cAMP)]. نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها (شکل ریبوز) به‌صورت زیر نامگذاری می‌شوند:

Base	*Nucleoside*	*Nucleotide*
Adenine	Adenosine	AMP, ADP, ATP
Guanine	Guanosine	GMP, GDP, GTP
Hypoxanthine	Inosine	IMP
Xanthine	Xanthosine	XMP
Cytosine	Cytidine	CMP, CDP, CTP
Uracil	Uridine	UMP, UDP, UTP
Thymine	dThymidine	dTMP, dTTP
Orotic acid	Orotidine	OMP

نوکلئوزیدها و **بازهای جزئی (تغییریافته)** نیز در اسیدهای نوکلئیک وجود دارند. بازهای متیله یک گروه متیل متصل به یک گروه آمینوپورفیرین (N-متیل گوانین)، یک اتم حلقه (۱-متیل آدنین)، یا بر روی یک گروه هیدروکسیل قند (′۲-O-متیل آدنوزین) دارند. در دی‌هیدرواوراسیل پیوند دوگانه ۶-۵ احیاء شده است. در پسودواوریدین ریبوز به‌جای نیتروژن ۱ به کربن ۵ متصل است.

در **پلی‌نوکلئوتیدها** (اسیدهای نوکلئیک)، منونوکلئوتیدها توسط پیوندهای بین ′۳-هیدروکسیل یک قند (ریبوز یا داکسی‌ریبوز) و ′۵-هیدروکسیل بعدی به یکدیگر متصل هستند (برای ساختمان صفحه ۳۶ را ببینید).



نمایه

آ

الف

ب

پ

ت

ث

ج

چ

ح

خ

د

ذ

ر

ش

ص

ض

ع

غ

ف

ق

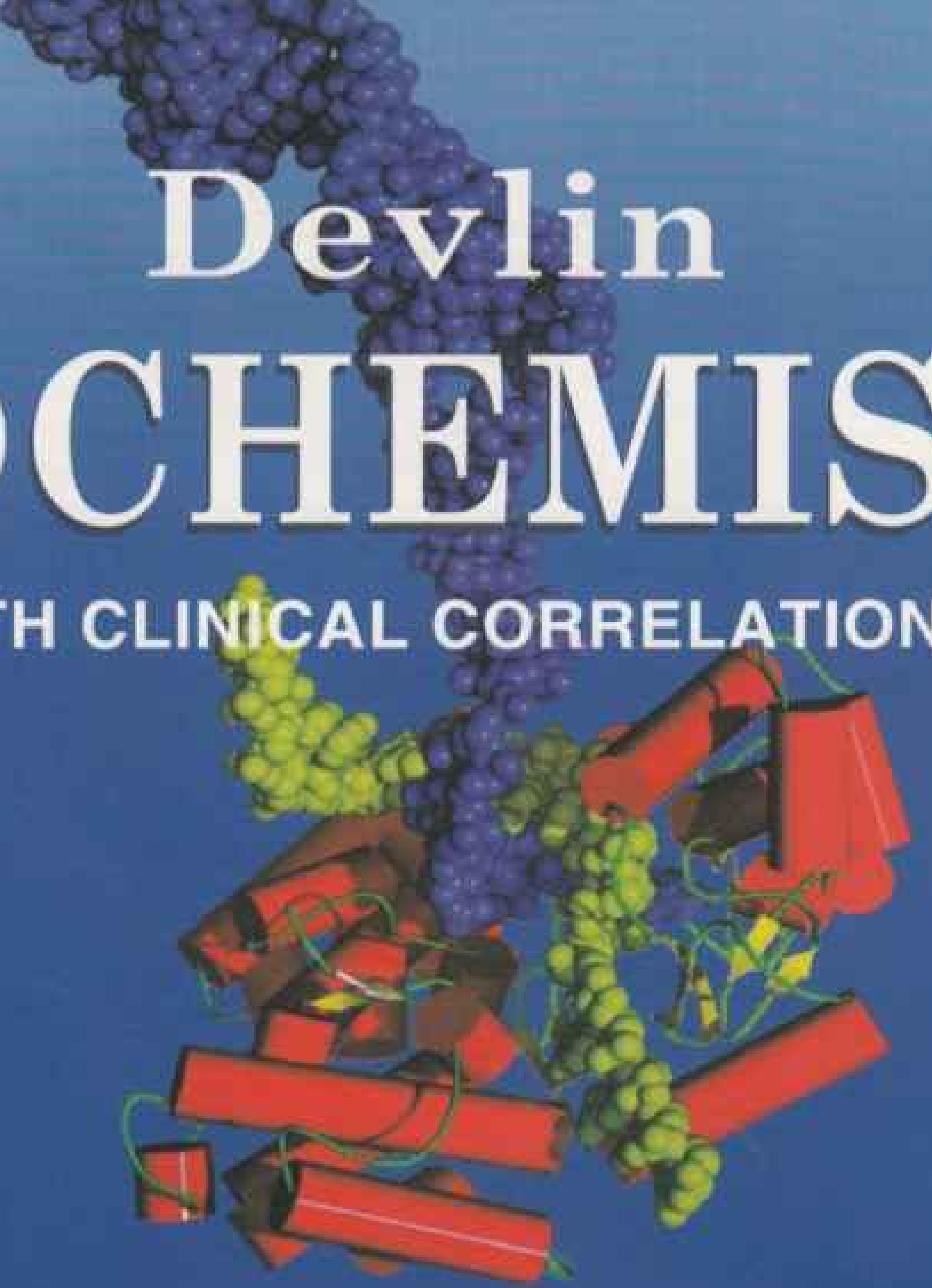
ک

ل

م

ن

ی



Devlin

BIOCHEMISRY

WITH CLINICAL CORRELATIONS



Volume 1

Seventh Edition

R. Mohammadi *Ph.D.*

شابک دوره : ۳-۴۵۹-۹۷۰-۹۶۴-۹۷۸
ISBN:978-964-970-457-9
9789649704579

آییژ